



# VÝVOJ NANO-VLÁKENNÉ KOMPOZITNÍ MEMBRÁNY S OBSAHEM ANTIBAKTERIÁLNÍCH ADITIV

## Diplomová práce

*Studijní program:* N3108 – Průmyslový management  
*Studijní obor:* 3106T014 – Produktový management - Textil  
*Autor práce:* **Bc. Barbora Smýkalová**  
*Vedoucí práce:* Ing. Daniela Lubasová, Ph.D.





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC  
Faculty of Textile Engineering



# DEVELOPMENT OF NANO-FIBRE COMPOSITE MEMBRANES CONTAINING ANTIBACTERIAL ADDITIVES

**Diploma thesis**

*Study programme:* N3108 – Industrial Management

*Study branch:* 3106T014 – Product Management - Textile

*Author:* **Bc. Barbora Smýkalová**

*Supervisor:* Ing. Daniela Lubasová, Ph.D.



Tento list  
nahradíte  
originálem  
zadání.

## Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Diplomovou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé diplomové práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 19.5.2014

Podpis:

## PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla velmi poděkovat Ing. Daniele Lubasové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc se zpracováním diplomové práce a nezměrnou trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat paní Doc. Mgr. Ireně Lovětínské Šlamborové za odbornou pomoc s antibakteriálními testy a panu Ing. Pavlu Kejzlarovi za odborné vedení při zpracování SEM snímků a EDX analýz.

## **ANOTACE**

Diplomová práce je zaměřena na vývoj nanovláknenné membrány s antibakteriálními vlastnostmi. Rešeršní část se zabývá popisem výroby nanovláknenných struktur. Detailněji je charakterizováno elektrostatické zvlákňování včetně parametrů a polymerů vhodných pro zvlákňování. Dále je uvedena problematika bakterií a jejich potenciální nebezpečí pro okolní prostředí. Následně jsou popsány možnosti, jak růst bakterií zastavit. Poslední část je věnována současným trendům ve výzkumu přípravy materiálů s antibakteriálními vlastnostmi.

Cílem experimentální části bylo připravit nanovláknennou membránu se čtyřmi různými antibakteriálními aditivami o různých koncentracích. Byl zvolen dvojí způsob inkorporace antibakteriální složky, internální a externální. Takto připravené nanovláknenné membrány byly analyzovány metodou EDX a SEM, a následně byly provedeny testy antibakteriální účinnosti metodou AATCC 100 a AATCC 147. Na závěr byly dosažené výsledky shrnuty.

### **KLÍČOVÁ SLOVA:**

Nanovláknna, elektrostatické zvlákňování, antibakteriální vlastnosti

## **ANNOTATION**

The thesis is focused on the development of nanofiber membrane with antibacterial properties. The theory deal with the description of production of the nanofibres. The parameters of electrospinning, and the suitable polymers are characterized to the detail. The following chapter is an issue of bacterium and their potential risk to the environment. Subsequently, possibilities of how to stop the growth of bacteria are listed. The last chapter is devoted to current trends in research of development of structures with antibacterial properties.

The aim of experiment was to prepare a nanofiber membrane with four different antibacterial additives with different concentrations. Two ways of incorporation of antibacterial additives, an internal and an external, was chosen. Thus prepared nanofiber membranes were analyzed by EDX and SEM, to investigate the presence of antibacterial additives and its homogeneous dispersion. Consequently, antibacterial efficiency tests involving method AATCC 100 and AATCC 147 were performed. In conclusion, the results were summarized.

### **KEYWORDS:**

Nanofibers, electrospinning, antibacterial properties

## OBSAH

ÚVOD .....	13
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	14
1.1 Bakterie .....	14
1.2 Testování antibakteriálních vlastností .....	22
1.3 Nanovlákná .....	26
1.4 Podstata elektrostatického zvlákňování .....	26
1.5 Trend ve výzkumu a vývoji nanomateriálů .....	29
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	34
2.1 Použité chemikálie .....	34
2.2 Použitá zařízení .....	39
2.3 Použité testovací metody .....	42
2.4 Testování antibakteriálních vlastností .....	43
2.5 Optimalizace polymerního roztoku pro přípravu nanovláknenné membrány .....	44
2.6 EDS analýza připravených vzorků .....	51
2.7 Antibakteriální testování nanovláknenných membrán .....	55
2.8 Shrnutí dosažených výsledků .....	65
ZÁVĚR .....	68
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	70
SEZNAM PŘÍLOH .....	76
Příloha A: .....	77
Příloha B: .....	79
Příloha C: .....	83
Příloha D: .....	84



## SEZNAM OBRÁZKŮ

1. Tvary bakteriálních buněk.....	15
2. Stavba bakteriální buňky.....	15
3. Rozdíl ve stavbě buněčné stěny.....	17
4. Gramnegativní kolonie <i>E. coli</i> a, Grampozitivní kolonie <i>S. aureus</i> .....	18
5. Křivka růstu bakteriální populace.....	19
6. Rozdíl mezi baktericidním a bakteriostatickým účinkem.....	21
7. Difúzní diskový test a E-test.....	23
8. Mikrotitrační destička.....	24
9. Schéma zařízení pro elektrostatické zvlákňování z trysky .....	27
10. Síťovací reace PVA.....	37
11. Zařízení pro elektrostatické zvlákňování.....	39
12. Schéma laboratorního zařízení pro elektrostatické zvlákňování.....	40
13. Schéma pro externí způsob inkorporace antibakteriální složky.....	41
14. Schéma EDX.....	42
15. Vliv povrchově aktivní látky na výsledný vzhled nanomembrány.....	45
16. Zvyšování koncentrace antibakteriálního aditiva 1, 5 a 10hm. %: a) SnO <sub>2</sub> , b) TiO <sub>2</sub> , c) ZnO, d) ZrO <sub>2</sub> .....	46
17. Porovnání SEM snímků internální (vlevo) a externální (vpravo) způsob inkorporace antibakteriálního aditiva o koncentraci 10 hm. %: a) SnO <sub>2</sub> , b) TiO <sub>2</sub> , c) ZnO, a d) ZrO <sub>2</sub> .....	48
18. Zvyšování koncentrace antibakteriální složky v nanomembráně CH/PEO z 1 na 10hm. %: a) SnO <sub>2</sub> , b) TiO <sub>2</sub> , c) ZnO, a d) ZrO <sub>2</sub> .....	49
19. Porovnání SEM snímků internální (vlevo) a externální (vpravo) způsob inkorporace antibakteriálního aditiva 10 hm. %: a) SnO <sub>2</sub> , b) TiO <sub>2</sub> , c) ZnO, a d) ZrO <sub>2</sub> .....	51
20. Halo zóna pro zesíťovanou nanomembránu PVA s přídavkem 10 hm. % ZnO.....	56
21. Výsledky pro nanomembránu PVA s přídavkem ZnO.....	57
22. Výsledky antibakteriálního testování metodou AATCC 100 pro membránu s přídavkem ZnO.....	61

## SEZNAM TABULEK

1. Hmotnost odvažovaných antibakteriálních aditiv.....	44
2. Hmotnost antibakteriální složky přidávané do membrány rozprašováním v průběhu elektrostatického zvlákňování.....	48
3. Hmotnost antibakteriální složky přidávané do membrány rozprašováním v průběhu elektrostatického zvlákňování.....	50
4. Shrnutí výsledků testovaných PVA vzorků (zesíťovaných) metodou AATCC 100.....	56
5. Shrnutí výsledků testovaných PVA vzorků (nesíťovaných) metodou AATCC 147.....	57
6. Shrnutí výsledků testovaných PVA vzorků (síťovaných) metodou AATCC 100.....	59
7. Shrnutí výsledků testovaných CH/PEO vzorků metodou AATCC 100.....	63

## SEZNAM GRAFŮ

1. EDS - $\text{SnO}_2$ (internálně) .....	52
2. EDS - $\text{SnO}_2$ (internálně X externálně) .....	53
3. EDS - $\text{SnO}_2$ (internálně) .....	58
4. Procento inhibice pro membrány z PVA (nesítované) vůči kmenu: <i>S. aureus</i> a <i>E. coli</i> .....	54
5. Procento inhibice pro membrány z PVA internálně vs .externálně inkorporovaná aditiva .....	60
6. Procento inhibice pro membrány z CH/PEO internálně vs. externálně inkorporovaná aditiva .....	62

## SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

AATCC	American Association of Textile Chemists and Colorists, americká asociace textilních chemiků a koloristů	
CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute	
ČSN	česká technická norma	
DNA	deoxyribonukleová kyselina	
EDX	Energy-dispersive X-ray spectroscopy, energiově disperzní analýza rentgenovými paprsky	
EN	European Standards, evropská norma	
CH/PEO	chitosan/polyethylenoxid	
ISO	International Organization for Standardization, mezinárodní organizace pro normalizaci	
MBC	minimální baktericidní koncentrace	
MIC	minimální inhibiční koncentrace	
NaCl	chlorid sodný	
PAL	povrchově aktivní látka	
pH	koncentrace vodíkových iontů	
PVA	polyvinylalkohol	
RNA	ribonukleová kyselina	
SEM	Scanning Electron Microscope, Rastrující elektronový mikroskop	
SnO <sub>2</sub>	oxid cíničitý	
TEM	Transmission Electron Microscope, transmisní elektronový mikroskop	
TiO <sub>2</sub>	oxid titaničitý	
TUL	Technická univerzita v Liberci	
WHO	World Health Organization, světová zdravotnická organizace	
XRD	X-ray diffraction, rentgenová difrakce	
ZnO	oxid zinečnatý	
ZrO <sub>2</sub>	oxid zirkoničitý	
M <sub>m</sub>	[g/mol]	molární hmotnost
U	[V]	napětí
η	[Pa.s]	viskozita
ρ	[g.cm <sup>-3</sup> ]	hustota

---

## ÚVOD

Bakterie jsou nejdominantnějším druhem žijícím na Zemi. Většina z nich je pro člověka neškodná, ale existují i takové druhy, které jsou silně patogenní a mohou způsobovat celou řadu bakteriálních onemocnění. Tyto infekční nemoci provázejí lidstvo už od samého počátku, ale až do poměrně nedávné doby měla medicína jen omezené možnosti, jak tyto infekční onemocnění s úspěchem likvidovat. Většinou se jednalo o různé látky rostlinného původu, které mají antibakteriální účinky (byliny, česnek,...). Je známo, že první cílená léčba byla šířena lékařem Paracelsem (1493-1541). Jednalo se o tzv. „šedou masť“, která byla určena k léčbě syfilitických vředů. Základem této masti byla suspenze rtuti a sádla. Rtuť se přes ránu vstřebala a mohla v postižené tkáni působit baktericidně. Za nejvýznamnější je považován objev penicilínu Alexanderem Flemिंगem (1881-1955) a postupný vývoj dalších antibiotik ve 30. letech 20. století a jejich všeobecné rozšíření po druhé světové válce. Tento objev vedl zpočátku k všeobecnému názoru, že se podaří většinu infekčních onemocnění, které ohrožují lidskou populaci vymýtit. Bohužel opak je pravdou, s tím jak se mění prostředí, ve kterém žijeme, mění se i strategie přežití bakterií. Bakterie zareagovaly na nové podmínky adaptací a mutací, včetně modifikace své DNA. Tím si dokázaly na penicilin a postupně i další antibiotika, vytvořit rezistenci. Tyto procesy mají zásadní dopad i na kvalitu života lidí v dnešní době. Dnes se, zejména v nemocničním prostředí setkáváme i s velmi odolnými bakteriemi. Nedávno zveřejněná zpráva Světové zdravotnické organizace (WHO), varuje před stále narůstající rezistencí bakterií i na velmi silná antibiotika.

Na základě výše zmíněného se diplomová práce zabývá vývojem nanovlákněné membrány s obsahem antibakteriálních aditiv ve formě nanočástic oxidů kovů. Výhoda těchto nanočástic je zejména ve velikosti aktivní plochy, kdy díky svým rozměrům mohou prostupovat i buněčnou membránou, poškozovat ji, což může vést až ke zničení bakteriální buňky. Tato membrána byla vyrobena, metodou elektrostatického zvláknění vybraného typu polymeru s přidavkem antibakteriálních nanočástic oxidů kovů. Tyto nanovlákněné membrány by mohly najít uplatnění v medicínských aplikacích, jakými jsou obvazové materiály, ochranné polštářky pro krytí ran, ale i v kosmetickém průmyslu.

---

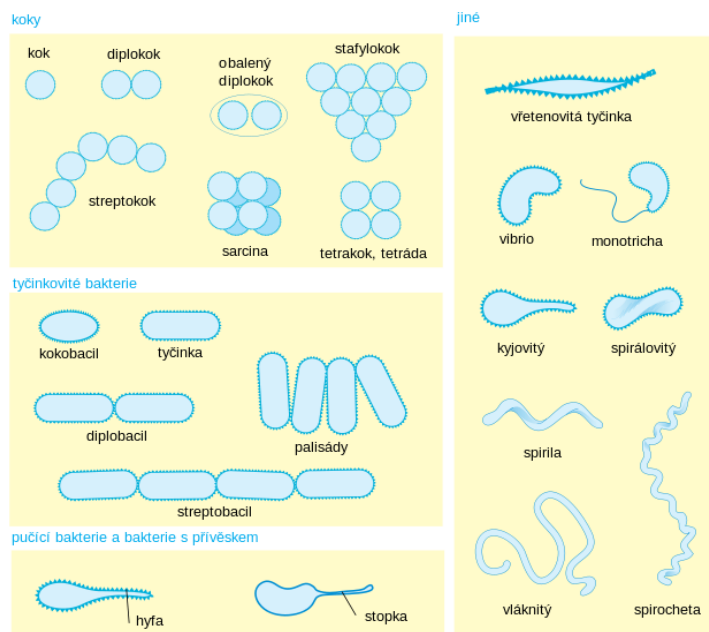
# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Bakterie

Bakterie jsou jednobuněčné prokaryontní organismy patřící do domény Bacteria. Bakterie jsou všudypřítomné, nejvíce jich je v půdě, ve vodě, velmi mnoho se jich vyskytuje v těle a na tělech organismů, rostlin, živočichů i na těle člověka. Hmotnostně představují asi polovinu živé hmoty na Zemi. Vyskytují se i v tak extrémních podmínkách, kde jiné formy života už nenajdeme. Velké množství různých druhů bakterií je možné nalézt zejména na kůži, ve vlasech a v intestinálním traktu. Řádově s sebou dospělý člověk nosí  $10^{15}$  mikrobů, s nimi žije za normálních okolností ve vzájemně prospěšném stavu – v symbióze, ve stavu komenzalismu, což je situace, která vyhovuje jak mikrobům (bakteriím), tak člověku. Během svého života se pak jedinec setkává i s bakteriemi, které jsou pro něj výrazně patogenní a mohou u něj vyvolávat celou řadu infekčních onemocnění. [1,2,3]

### 1.1.1 Morfologie bakterie

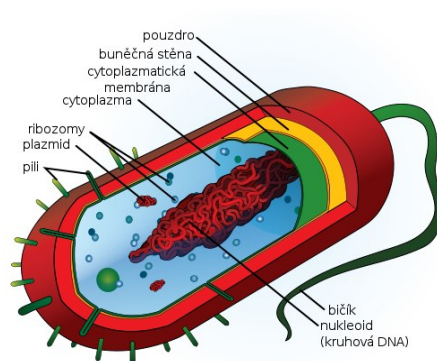
Velikost bakteriální buňky značně kolísá podle rodu, druhu a také podle stáří, kultury a kultivačních podmínek. Obecně lze konstatovat, že mladé buňky jsou větší a silnější, než ty staré. Velikost se pohybuje v rozmezí jednotek až stovek  $\mu\text{m}$ . Podle tvaru bakteriálních buněk, se dělí do několika skupin (viz obr. 1.). Bakterie kulovitého tvaru nazýváme koky. Bakterie protáhlého tvaru označujeme jako bacily nebo tyčinky. Bakterie také mohou mít zakřivený tvar, například spirily nebo vibria nebo tvar dlouhých tenkých vláken. Některé bakterie vytvářejí charakteristická seskupení, například streptokoky a jiné. [1,2]



Obr. 1. Tvary bakteriálních buněk, převzato z [4]

### 1.1.1.1 Buněčné struktury

Struktura bakteriální buňky je vyobrazena na následujícím obr. 2. Jádro bakterií není ohraničeno jadernou membránou. Je tvořeno jedinou do kruhu uzavřenou závitnicovou molekulou deoxyribonukleové kyseliny (DNA, nositel genetických informací, označuje se jako nukleoid), která tvoří bakteriální chromosom, který je volně uložený v cytoplasmě. Doplnkovým zdrojem genetické informace pro doplňkové vlastnosti mohou být plazminy. Plazminy se replikují nezávisle na nukleoidu.



Obr. 2. Stavba bakteriální buňky, převzato z [5]

*Cytoplasma* vyplňuje vnitřní prostor bakterií, jsou v ní rozptýleny ribozomy, plazmidy, zásobní granula a řada enzymů. Cytoplasma je zevnitř ohraničena polopropustnou

cytoplasmatickou membránou, která působí jako osmotická bariéra. Obsahuje oxidační enzymy, cytochromy, permeázy a další enzymy.

*Ribozomy* jsou složeny z ribonukleové kyseliny (RNA). Na ribosomech se uskutečňuje syntéza bakteriálních bílkovin.

*Plazmidy* představují velmi malé části extrachromozomálně uložené DNA a jak již bylo řečeno, nejsou nezbytně nutné pro existence bakterie. Plazmidy zajišťují v buňce různé další funkce, jako je tvorba toxinů a enzymů a také rezistenci na antibiotika (R plazmidy). Plazmidy mohou být předávány z jedné bakterie do další.

*Buněčná stěna* je na povrchu bakterie, zevnitř nad cytoplasmatickou membránou, zajišťuje pevnost a tvar bakterie. Obsahuje také důležité antigeny – lipopolysacharidy, peptidoglykany, podle kterých můžeme určovat antigenní strukturu bakterií.

*Pouzdro* se tvoří jen u některých druhů bakterií a obklopuje bakterii zevně, zvyšuje jejich odolnost. U většiny bakterií je tvořeno polysacharidy, v případě streptokoka ze skupiny A kyselinou hyaluronovou.

*Pili (fimbrie)* jsou jemné brvy, které pokrývají povrch bakterií, pomáhají bakterii při přilnutí (adhezi) na sliznice a umožňují tak následný průnik bakterií do hlubších partií.

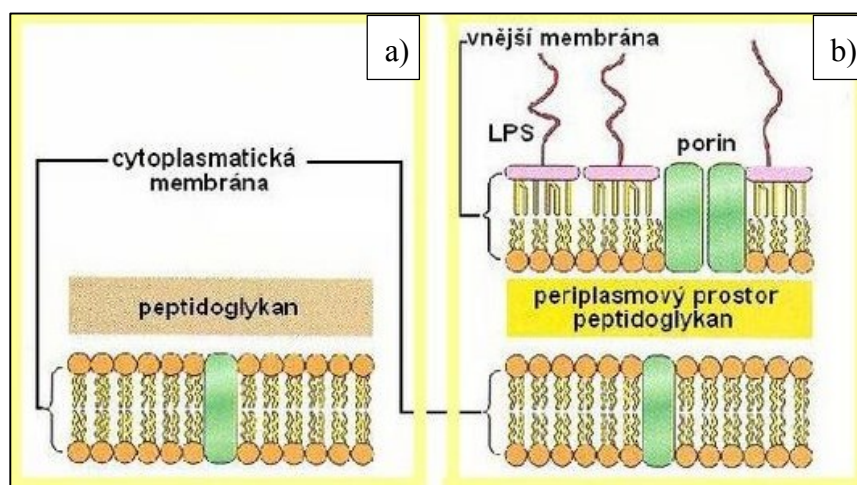
*Bičíky (flagella)* představují orgány pohybu, jsou tvořeny kontraktilními bílkoviny.

*Spory* jsou kulaté nebo oválné útvary tvořeny některými bakteriemi (sporulujícími). V případě zhoršení životních podmínek (vyčerpání živin, vyschnutí, atp.). Spory jsou velmi odolné k vnějším vlivům, k vyschnutí, vysoké teplotě, chemickým látkám atd. Spory mohou přetrvávat v latentním stavu i desítky let a za příznivých podmínek mohou znovu vyklíčit ve vegetativní formy bakterií, schopné vyvolat onemocnění.[2,3]

### 1.1.2 Rozlišení bakterií

Na základě Gramovy reakce se bakterie dělí do dvou skupin: grampozitivní a gramnegativní. Rozdíl mezi skupinami je v tom, že grampozitivní bakterie po obarvení trifenylnmethanovým barvivem (krystalová violet) a následným mořením roztokem jodidu draselného zadržují komplex krystalové violeti a jodidu draselného v buněčné stěně a neobarvuje se organickými rozpouštědly. U gramnegativních bakterií je tento komplex z buněčné stěny organickými rozpouštědly (etanolem či acetonem) vymýván. Použije-li se

po odbarvovacím procesu druhé barvivo, nejčastěji to bývá safranin, zbarví se gramnegativní bakterie červeně. U grampozitivní bakterie zůstanou zbarveny fialově. Buněčnou stěnu grampozitivních bakterií tvoří peptidoglykeny a teikoové kyseliny. Tato buněčná stěna je relativně silná. Oproti tomu buněčná stěna gramnegativních bakterií je výrazně tenčí a má složitější strukturu. Je tvořena tenkou vrstvou peptidoglykanů, je obklopena druhou lipidovou membránou, která obsahuje lipopolysacharidy a lipoproteiny. Většina bakterií má gramnegativní buněčnou stěnu. Rozdílnost ve struktuře buněčné stěny může mít vliv na rozdílnou vnímavost vůči antibiotikům. [2,3]



Obr. 3. Rozdíl ve stavbě buněčné stěny: a) gramnegativní buněčná stěna, b) grampozitivní buněčná stěna, převzato z [10]

Dle normy ČSN EN ISO 20645 – Plošné textilie – Zjišťování antibakteriální aktivity – Zkouška agarovou destičkou, metoda AATCC 100 a AATCC 147 je antibakteriální účinek testován na gramnegativním bakteriálním kmenu *Escherichia coli* (viz obr. 4.) a grampozitivním bakteriálním kmenu *Staphylococcus Aureus* (viz obr. 5.). Níže jsou uvedeny základní charakteristiky těchto bakterií.

### ***Escherichia coli* (E. coli)**

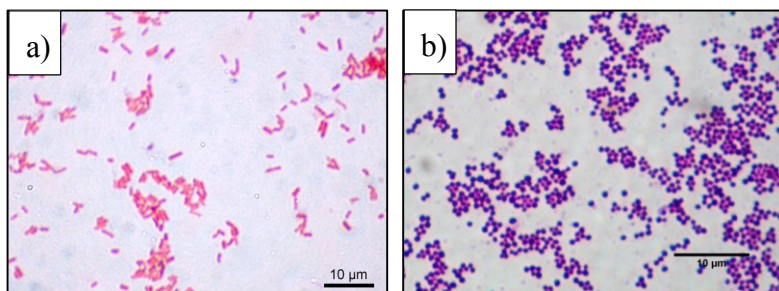
Bakterie je fakultativně anaerobní a je běžnou součástí mikroflóry tlustého střeva. Tvar je tyčinkovitý se zaoblenými konci. Délka tyčinky je 2-3  $\mu\text{m}$ , šířka cca 0,6  $\mu\text{m}$ . Na povrchu mají fimbrie, kterými se pohybují. Nesporují a některé typy *E. coli* tvoří pouzdra a jejich kolonie mají charakter hlenu. Patogenní kmeny *E. coli* vyvolávají zejména záněty močových cest, septická onemocnění, infekce ran, hnisavé procesy a průjemové infekce.



Bakteriální infekce se zpravidla léčí podáváním antibiotik. Avšak v současnosti je stále větší množství kmenů *E. coli* k podávaným antibiotikům rezistentní.[2,3,11,12]

### **Staphylococcus aureus (S.aureus)**

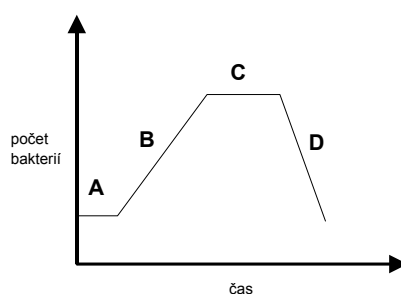
Je též fakultativně anaerobní kokovitá bakterie. Je nesporeující a nepohyblivá. Jednotlivé sférické koky mají průměr cca 0,7 – 0,9  $\mu\text{m}$ . Člověk je běžně kolonizován stafylokoky, nejvíce na kůži rukou a na sliznici dýchacího a zažívacího traktu. Asi u 20 – 50% populace je tato bakterie přirozeně přítomna. Nicméně nebezpečné jsou stafylokokové infekce získané v nemocnicích a zvláště ohroženou skupinou jsou osoby se sníženou imunitou, např. novorozenci, starší pacienti. *S. aureus* se řadí mezi biochemicky velmi aktivní bakteriální druhy, protože produkuje řadu exoenzymů a toxinů, které způsobují ničení tkáně nemocného a tedy způsobují široké spektrum onemocnění a intoxikace v rozsahu od mírných zánětů kůže a měkkých tkání, sepse (reakce organismu na infekci), syndrom toxického šoku. Tato bakterie je velmi rezistentní, odolává zahřátí na 55 °C po dobu 30 minut, sušení i mrazení a je též tolerantní k prostředí s vyšší koncentrací NaCl (10-15%). Většina kmenů (až 90%) je v současné době rezistentní k penicilinu. [2,3,11,12]



Obr.4. a) Gramnegativní kolonie bakterie *E. coli*, b) Grampozitivní kolonie bakterie *S. aureus*, převzato z [13,14]

#### **1.1.2.1 Růst bakterií**

V závislosti na vhodných okolních podmínkách bakterie rostou a množí se. Množení bakterií probíhá binárním dělením, které se opakuje a kdy z jedné buňky mateřské vzniknou dvě rovnocenné buňky dceřiné. Různé fáze růstu bakterií lze vyjádřit pomocí růstové křivky na obr. 5.



Obr. 5. Křivka růstu bakteriální populace

Když se populace bakterií dostane do prostředí bohatého na živiny, bakterie se v první fázi na toto prostředí adaptují, tato fáze se nazývá lag fáze (A), toto období je charakteristické pomalým růstem, ale vysokou biosyntetickou aktivitou. Následuje druhá fáze, tzv. log fáze (B), která je charakteristická logaritickým (exponenciálním) růstem, která trvá za současné rychlé metabolizace živin až do té doby, než se jedna živina nevyčerpá. Další fází je fáze stacionární (C), která trvá až do spotřeby všech živin. V této fázi bakterie snižují svou metabolickou aktivitu a spotřebovávají neesenciální buněčné proteiny. Poslední fáze značí odumírání bakterií (D), tato fáze je charakteristická převahou odumřelých bakterií nad nově vzniklými. [3]

### 1.1.3 Bakterie a prostředí

Většina bakterií se při kontaktu s vnějším povrchem jiného makroorganismu chová pasivně, nicméně některé bakteriální druhy mají schopnost makroorganismus kolonizovat. Proniknutí bakterie do vnitřního organismu a její rozmnožení v něm nazýváme infekcí. Vzniklý vztah mezi makroorganismem v něm usídlenou bakterií může být vztahem vzájemné součinnosti (symbióza) nebo vztahem jednostranného využívání partnera (parazitismus). Vztah parazita k hostiteli je proměnlivý v širokém rozmezí. Od rovnováhy, trvalé mírové koexistence až po nerovnováhu projevující se buď poškozením až smrtí hostitele nebo likvidací parazita. Parazitické bakterie jsou většinou nazývány patogenními a jimi vyvolanou nerovnováhu pak označujeme jako nemoc hostitele. Patogenita je vlastností v dané konkrétní situaci kvantifikovatelnou a jejím kvantitativním vyjádřením je virulence. Každý patogen má charakteristické spektrum interakcí s hostitelem. Některé organismy, které jsou běžnou součástí lidské mikroflóry a běžně se vyskytují na kůži či v nosní dutině, mohou též způsobovat onemocnění kůže, tuberkulózu, meningitidu a další.[2,3] Řada bakterií především grampozitivních tvoří a vylučuje do okolního prostředí látky bílkovinné

povahy, které jsou nazvány toxiny. Toxiny mohou patogenně působit přímo na cílové buňky nebo mají schopnost ovlivňovat buňky imunitního systému a způsobovat onemocnění.[2]

#### 1.1.4 Antibakteriální prostředky

Nejčastěji se k léčbě bakteriálních onemocnění používají antibiotika. Jsou to látky původně mikrobiálního původu používané k léčbě infekčních chorob. Ale existuje i mnoho jiných chemických látek, které působí na životní funkce bakteriální buňky negativně. Působí selektivně a jejich účinek může být baktericidní nebo bakteriostatický (viz obr. 8.). Látky s bakteriostatickým účinkem způsobují zastavení buněčného růstu, kdy se počet buněk již dále nezvyšuje a nedochází k dalšímu buněčnému dělení. Podstatou je reversibilní blokáce funkcí makromolekul bílkovin a nukleových kyselin, tím dochází k zastavení některé fyziologické funkce v buňce. Látky s baktericidním účinkem zastavují baktericidní cyklus, způsobují ireversibilní a neopravitelnou destrukci buněčné komponenty, tím dochází ke ztrátě životaschopnosti buněk a způsobují jejich úhyn. Mezi oběma účinky ale není ostrá hranice. Rozlišujeme několik způsobů likvidace bakterií:

- *Dezinfekce*: usmrcení bezprostředně nebezpečných patogenních bakterií, aniž jsou však zahubeny absolutně všechny živé zárodky včetně spor
- *Sterilizace*: odstranění všech živých organismů včetně spor (vzniká sterilní prostředí)
- *Chemoterapie*: selektivní poškození parazitických bakterií v prostředí makroorganismu bez většího poškození hostitele
- *Antiseptika*: sloučeniny, které jsou méně toxické, a přitom usmrcují patogenní bakterie [3]

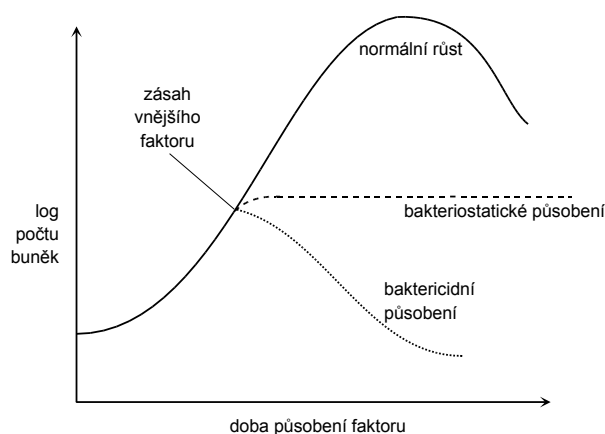
#### Nejznámější baktericidní látky jsou:

- *Fenolické sloučeniny* - denaturují proteiny a do 24 hodin usmrtí vše
- *Oxidující látky* – oxidují funkční skupiny biomolekul, chlór (úprava pitné vody), jód (jódová tinktura)
- *Alkohol* – působí baktericidně jen ve vysoké koncentraci (>70 %)
- *Formaldehyd a některé jiné aldehydy* - velmi účinné, zabíjejí nejen buňky, ale i spory, mohou být jedovaté

- *Těžké kovy, zejména rtuť (sublimát – chlorid rtuťnatý)* – působí na strukturu a funkci bílkovin v buňce
- *Kyseliny a louhy* – destrukují biomolekuly vysokou koncentrací  $H^+$  nebo  $OH^-$
- *Alkylující látky* – etylenoxid – alkylují vodík ve funkčních skupinách biomolekul
- *Povrchově aktivní látky (PAL), detergenty* – velmi rozšířené, poškozují strukturu buněčné membrány. Do této kategorie lze zařadit i mýdla (základní prostředek osobní hygieny) [3,11]

### Bakterie lze zahubit i fyzikálními činiteli:

- vyšší teploty - dělení bakterií podle optimální teploty
- ultrafialové světlo - extrémně destruktivní na všechny bakterie [11]



Obr. 6. Rozdíl mezi baktericidním a bakteriostatickým účinkem

Problémem při léčbě bakteriálních onemocnění je rezistence bakterií vůči antibiotikům, z důvodu nadužívání antibiotik v druhé polovině minulého století. Geny rezistence v bakteriích se mohou nacházet jak na chromozomech, tak na plasmidech. Rezistence může vznikat náhodným procesem mutace nebo si geny rezistence mohou bakterie předávat konjugací nebo transformací. [3] V současné době se proto odstupuje od léčby pomocí antibiotik a hledají se nová řešení, která by rezistenci nevyvolávaly.

---

## 1.2 Testování antibakteriálních vlastností

### 1.2.1 Testování antibakteriálních účinků

Cílem antibakteriálního testování je určení citlivosti mikroorganismu (bakterie, případně viry) na účinnou látku (antibiotika). Obecně lze antibakteriální vlastnosti určité látky testovat několika způsoby. Podle metody a informace kterou laboratorní vyšetření poskytuje, rozlišujeme:

- *Kvalitativní (difúzní) test* – testuje se pouze jedna koncentrace účinné látky, při které výsledek testování určí, jestli je bakteriální kmen citlivý nebo rezistentní na účinnou látku
- *E-test* -využívá gradient účinné látky (antibiotika) na nosiči s měřítkem, na kterém lze přímo v místě hranice inhibiční zóny odečíst hodnotu minimální inhibiční koncentrace (MIC)
- *Kvantitativní (diluční) testy* – testuje se se sadou koncentrací testované látky (antibiotika)

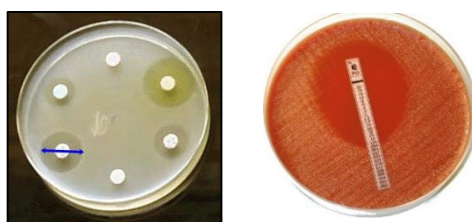
#### 1.2.1.1 Diskový difúzní test

Diskový difúzní test je standardní metoda pro kvalitativní stanovení citlivosti (bakteriálního) kmene k účinné látce (antibiotiku). Test se provádí na agarové půdě nalité do Petriho misky o tloušťce 4 mm. Kyselost půdy se pohybuje v rozmezí 7,2 – 7,4 pH. Na růstový agar je pomocí sterilního tampónu rovnoměrně naočkována bakteriální suspenze (inokulum). Koncentrace inokula je porovnávána se zákalovým standardem. Dále se na povrch agaru nakladou papírové disky nebo textilie obsahující antibakteriální aditivum. Inkubuje se v termostatu 18 – 24 hodin. Během inkubace dochází k difundaci účinné látky (antibiotika) z disku na povrch naočkovaného agaru. Časem dochází v důsledku přítomnosti účinné látky (antibiotika) k zastavení množení bakterií poblíž disku s účinnou látkou. Kolem testované látky se tvoří inhibiční zóna (viz obr. 7. a)). Po inkubaci se inhibiční zóna změří, a výsledky se porovnávají buď s referenčním vzorkem, nebo v případě léčiv se standardy CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) a následně dochází k interpretaci výsledku. V případě, že je velikost inhibiční zóny menší než je referenční rozmezí je bakterie vůči dané látce rezistentní, nebo velikost inhibiční zóny překračuje referenční rozmezí, v tom případě

je bakteriální kmen na účinnou látku citlivý. Na velikosti inhibiční zóny má vliv zejména citlivost bakteriálního kmene na účinnou látku a dále i rychlost množení bakterie.[15,16]

### 1.2.1.2 E – test

E-test (epsilometer test) je metoda pro kvantitativní a částečně kvalitativní vyšetření citlivosti, která kombinuje principy diskové difúzní a diluční metody. Jedná se o inertní plastický proužek, který máz jedné strany vyznačenou kontinuální stupnici antibakteriální látky spolu s jejím kódem, tato stupnice slouží k odečítání minimální inhibiční koncentrace (MIC). Druhá strana proužku obsahuje koncentrovanou antibakteriální látku v suchém stavu. Proužek se umístí stranou s účinnou látkou na Petriho misku, která již obsahuje živnou půdu s naočkovaným bakteriálním kmenem. Doba a podmínky inkubace závisí na testovaném mikroorganismu. V průběhu inkubace dochází postupně ke snižování koncentrace účinné látky a v okolí proužku vzniká inhibiční zóna ve tvaru „kapky“, v místě, kde elipsa protíná okraj proužku, odečítáme příslušnou hodnotu MIC, viz obr. 7. b) Dle hodnot MIC lze mikroorganismus označit za citlivý, citlivý v závislosti na dávce a rezistentní, dle CLSI standardu.[15,16]

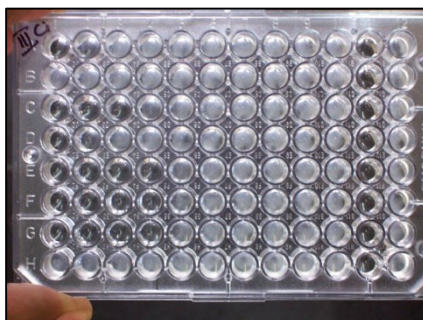


Obr.7 .a) Difúzní diskový test,b) E- tes, převzato z [17,18]

### 1.2.1.3 Diluční test

Další možností je diluční test, tato metoda se používá ke stanovení MIC, případně lze též stanovit minimální baktericidní koncentraci (MBC) – jedná se o nejnižší koncentraci dané látky, která usmrtí nejméně 99,9% populace mikroorganismů. Výhodou této metody je, že lze současně otestovat jeden bakteriální kmen vůči více (až 12ti) druhům účinné látky. Metoda je kvantitativní, standardizovaná a plně automatická. Nejčastěji se provádí diluční test v bujónu. Mikrotitrační destička má dvanáct sloupců (pro různé druhy účinné látky) většinou s osmi řadami jamek (pro až 8 koncentrací účinné látky, která je ředěna geometrickou řadou), viz obr. 8. Jamky se následně naočkují sérií koncentrací testované látky ve vhodném médiu (Mueller–Hintonův bujón). Do této směsi je následně přidána bakteriální suspenze. Po inkubaci 16-24 hodin při 37 °C, lze stanovit MIC, nejnižší

koncentraci dané látky, která zabrání viditelnému růstu (zákalu) bakterie v mikrotitrační jamce. MIC se stanoví v první nezakalené jamce. Odečítání výsledků je prováděno pomocí fotometru, který měří zákal v jamkách. Stanovení MBC probíhá tak, že se jamky s čirým bujónem vyočkují na pevné půdy a nechají se inkubovat. Jamka bez nárůstu bakteriálních kolonií udává MBC. [15,16]



Obr. 8. Mikrotitrační destička (nezakalené jamky vykazují na antibakteriální aktivitu), převzato z [19]

### 1.2.2 Testování antibakteriálních vlastností textilií

Výše byly popsány obecné metody, které se používají pro testování antibakteriálních vlastností účinné látky zejména ve zdravotnictví. Nyní budou stručně popsány metody používané pro textilie. Mezi jednu z nejpoužívanějších norem pro testování antibakteriální efektivity textilních výrobků je norma:

*ČSN EN ISO 20743 Textilie – zjišťování antibakteriálního účinku textilních výrobků*

Norma stanoví zkušební metody pro zjištění antibakteriálního účinku takto upravených textilních výrobků, plošných a netkaných textilií, textilních výplní, oděvních materiálů i ostatního textilního zboží. Norma je platná pro všechny textilní výrobky, bez ohledu na typ použitého antibakteriálního prostředku (organického, anorganického, přírodního nebo syntetického) nebo na metodu aplikace (zpracování, následná úprava nebo roubování).

Norma popisuje tři možné způsoby testování:

- *absorpční metoda* - zkušební bakteriální suspenze naočkována přímo na zkušební vzorky
- *přenosová metoda* - zkušební bakterie jsou umístěny na agarovou miskou a přeneseny na zkušební vzorky
- *otisková metoda* - zkušební bakterie jsou umístěny na filtr a otisknuty na zkušební vzorky

Norma popisuje dva postupy pro hodnocení antibakteriální účinnosti. První je metoda počítání kolonií, a druhou je luminiscenční metoda ATP (adenosin trifosfát), při které se měří množství ATP obsažené v buňkách bakterií. [20]

Dle informací z Textilního zkušebního ústavu lze antibakteriální účinnost textilií testovat dle následujících norem:

*1) ČSN EN ISO 20645 - Plošné textilie - Zjišťování antibakteriální aktivity - Zkouška šíření agarovou destičkou*

Zkouška je založena na principu difundování účinné látky do okolního prostředí provedením odpovídá Diskovému difuznímu testu, uvedeném v kapitole 1.2.1.1, kdy se kolem testovaného materiálu vytváří působením účinné látky inhibiční zóna, jejíž velikost se měří. [21]

*2) AATCC Testovací metoda: 100-2004 – Hodnocení antibakteriální úpravy na textilních materiálech*

U této metody je hodnocen faktor redukce bakterií, který udává, o kolik procent došlo ke snížení inokulované koncentrace bakterií. Test probíhá se dvěma bakteriálními druhy *S. aureus* a *K. pneumoniae* nebo *E. coli*. Bakterie jsou inokulovány na testované vzorky. Po inkubační době 48 hodin, se spočítají bakteriální kolonie a vypočte se redukce v %. Doporučuje se testovaný vzorek porovnávat oproti standardu.

*3) AATCC Testovací metoda: 147-2004 – Hodnocení antibakteriální úpravy na textilních materiálech – metoda hodnocení paralelních pruhů*

Tato metoda by měla předcházet metodu AATCC 100. Jedná se o kvalitativní hodnocení, zda má účinná látka antibakteriální charakter či nikoli. Svým provedením i hodnocením odpovídá výše uvedené normě ČSN EN ISO 20645. [22]

*4) ČSN EN ISO 22610- Metoda stanovení odolnosti proti penetraci mikrobiálních zárodků za mokra*

Metoda se používá k testování odolnosti vzorku proti pronikání mikrobiálních zárodků nesených kapalinou. Testovaný vzorek se umístí na agarovou misku a na něj se umístí fólie se spóry bakterie *S. aureus*. Po dobu 15 minut je prováděn otěr jehož účinkem přecházejí bakterie z nosného materiálu přes vzorek na misku s agarem. Po 48 hodinové kultivaci je stanoven počet bakteriálních kolonií. [23]



---

5) ČSN EN ISO 22612- Metoda stanovení odolnosti proti penetraci mikrobiálních zárodků za sucha

Testované vzorky jsou umístěny v nádobách. Bakterie jsou nesený na částicích, které svou velikostí odpovídají šupinkám lidské kůže. Na testované vzorky je pomocí vibračního přístroje, naprášeno množství mastku kontaminovaného spórami *Bacillus subtilis* (B. subtilis). Spóry prochází přes vzorek a sedimentují na misku s agarem. Po kultivaci 24 hodin je stanoven počet bakteriálních kolonií. [24]

### 1.3 Nanovlákná

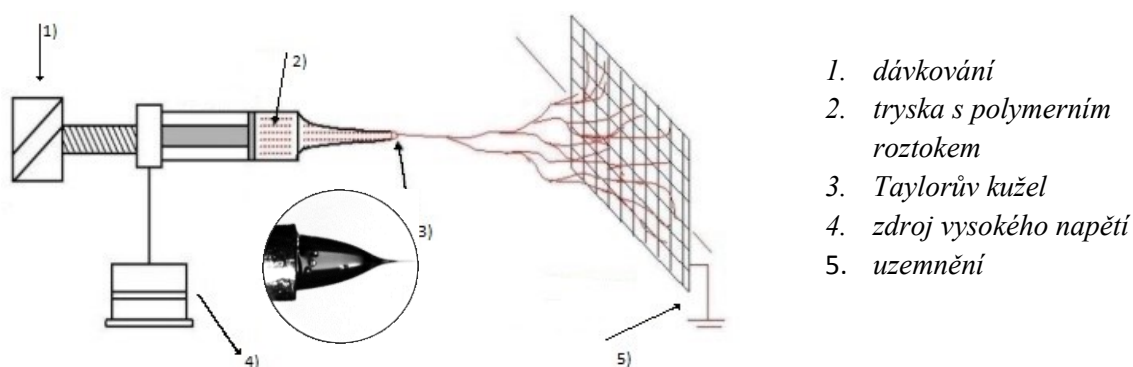
Nanovlákná jsou vlákna, jejichž poměr se pohybuje v submikronovém rozsahu. Předpona „nano-“ značí  $10^{-9}$ . Nanovlákná mají řadu vlastností, díky nimž jsou vhodnými kandidáty pro širokou škálu moderních aplikací, jako jsou vysoce účinné filtry, separační materiály, biologické aplikace, výztuhy pro kompozitní materiály, nebo zvukově pohltivé materiály. Novou oblastí pro použití nanovláken je regenerativní medicína, kde nanovláknenné materiály slouží jako scaffoldy (lešení) pro růst buněk. Nanovlákná jsou nositeli specifických vlastností. Díky svému velmi malému průměru mají velký měrný povrch. Jejich vnitřní struktura je vysoce krystalicky orientovaná. Tyto vlastnosti v důsledku znamenají velkou pevnost. Další z vlastností je permanentní elektrostatický náboj vázaný na materiál. Nanovláknenné vrstvy jsou velmi porézní a póry mají malé rozměry. Toto má význam především pro filtraci. [25,26]

Existuje několik způsobů, jak lze nanovlákná vyrobit: *dloužení, podložková syntéza, fázová separace, samo-organizování a elektrostatické zvlákňování* [27]

### 1.4 Podstata elektrostatického zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování je realizováno na zařízení pro zvlákňování z trysky. Toto zařízení se skládá ze zdroje vysokého napětí, zvlákňovací trysky, čerpadla a kolektoru viz obr 1. Polymerní roztok, případně tavenina, je dávkována požadovanou rychlostí pomocí čerpadla do zvlákňovací trysky. Polymerní roztok je přímo spojen se zdrojem vysokého napětí (řádově desítky kV). Proces elektrostatického zvlákňování vzniká, když se předá vysoké napětí na kapku polymerního roztoku, která je dávkována ze zvlákňovací trysky.

Toto napětí musí být dostatečně vysoké tak, aby překonalo vysoké povrchové napětí roztoku polymeru. V okamžiku, kdy se v roztoku nahromadí kritické množství náboje, dojde na špičce trysky k vytvoření Taylorova kužele, (viz obr. 9. b)) ze kterého jsou produkována vlákna. Taylorův kužel je důsledkem relaxace indikovaného náboje k volnému povrchu kapaliny na výstupu zvlákňovací trysky. Následuje vytlačení nabitého roztoku, vlákna proudí k uzemněnému sběrnému kolektoru. V průběhu dráhy nanovláken na kolektor dochází k odpaření rozpouštědla a tunutí vláken. V elektrickém poli, mezi špičkou trysky a kolektorem, se proud polymerního roztoku zrychluje a dochází k jeho dloužení. Na povrchu kolektoru se tvoří nanovláknenná vrstva.[1] Kolektorem je rovná kovová deska nebo mřížka, většinou pokrytá textilií, na které probíhá sběr nanovláken. Kapilára může být umístěna svisle nebo horizontálně nebo může být nakloněna v definovaném úhlu, čímž je kontrolován tok. [28,29]



Obr. 9. a) Schéma pro elektrostatické zvlákňování z trysky, b) detail Taylorova kužele, převzato z [27]

Další často využívaný způsob zvlákňování je tzv. zvlákňování z tyčky nebo metoda zvaná Nanospider. Tato metoda nevyužívá k formování vláken žádné trysky a kapiláry. Produktivita je podstatně vyšší, než produktivita ostatních metod. Obvykle je určena pro zpracování polymerů, ale je možné zvlákňovat i keramické nebo kovové materiály. Vlákná jsou formována pomocí elektrostatického pole z tenké vrstvy polymerního roztoku a jsou odebrána z kolektoru ve formě netkané textilie. Průměr vláken se pohybuje v rozsahu 100-300 nm, plošná hmotnost takto připravených nanovrstev je  $0,1-5 \text{ g.m}^{-2}$ . [26,27]

### 1.4.1 Parametry elektrostatického zvlákňování

Nejvýznamnější vliv na morfologii vláken připravovaných elektrostatickým zvlákňováním mají parametry zvlákňovaného roztoku. Důležitým z nich je viskozita připravovaného roztoku, molekulová hmotnost polymeru a koncentrace roztoku. Je dokázáno, že se zvyšující se viskozitou roztoku se zvyšuje průměr vznikajících vláken. Mezi další důležité vlastnosti patří povrchové napětí, vodivost roztoku a permitivita rozpouštědla. Při elektrostatickém zvlákňování je snaha o zachování nízkého povrchové napětí roztoku, čehož se docílí přidáním povrchově aktivní látky (PAL). Vodivost polymerního roztoku je zvyšována například přidáním soli, a jestliže roztok polymeru obsahuje rozpouštědlo s vyšší permitivitou, je lépe zvlákňitelný.

Mezi další významné vlivy na vláknennou morfologii se řadí procesní podmínky při zvlákňování. Sledují se parametry jako je dodávané napětí, teplota polymerního roztoku, typ kolektoru, průměr jehly (zvlákňovací trysky) a vzdálenost mezi hrotem jehly a kolektorem. Napětí má významný vliv na krystalinitu vláken a platí, že čím vyšší napětí je aplikováno, tím je průměr vlákna menší. Tvar, velikost, případně pohyb kolektoru určuje rozložení nanovláken ve vznikající vláknenné vrstvě. Často sledovaným parametrem je vzdálenost mezi hrotem jehly a sběrným kolektorem, která podstatně ovlivňuje intenzitu elektrického pole. Mezi další vlivy můžeme zařadit vlhkost, teplotu a prostředí zvlákňování, nicméně přímé dopady na parametry zvlákňování nejsou ještě zcela přesně popsány. [27,28]

### 1.4.2 Polymery vhodné pro zvlákňování

Metodou elektrostatického zvlákňování je možné zvláknit širokou škálu polymerů. Elektrostatické zvlákňování se ukázalo jako vhodná metoda pro zpracování většiny běžných polymerů, jako jsou polyolefiny, polyamidy, polyestery, aramidy, ale i biopolymery, nebo elektricky vodivé nebo fotonické polymery. Touto metodou lze vytvořit vlákna ze směsí polymerů a tedy i vlákna kompozitní. Mezi nespornou výhodou této metody je možnost přidání nanočástic ke zvlákňovatelnému polymernímu roztoku. Tyto částice se po zvlákňování zapouzdří v suchých vláknech. Tímto způsobem lze aplikovat mnoho aditiv se specifickými vlastnostmi do nanovláknenné vrstvy. Je možné vyrábět i vlákna různě profilovaná z různých druhů roztoků. Toto otvírá nové možnosti v aplikaci a použití jak vláken, či vyrobených kompozitních membrán vyrobených elektrostatickým zvlákňováním.[27,28]

Podstatně častější je tvorba vláken z polymerních roztoků. Hlavní nevýhodou zvlákňování z polymerních roztoků je použití rozpouštědel, která bývají často toxická.[25] Další riziko skýtá velikost nanočástic, které jsou extrémně malé (mohou pronikat stěnami buněk) současně s faktem, že mají vysokou povrchovou plochu (vysokou reaktivitu – oxidační porušení buněk). Bylo zjištěno, že nanočástice větší než 5 nm se ukládají zejména v plicních sklípcích a v oblasti nosu. Odstranění nanočástic z plic je pomalejší než u větších částic a mnoho nanočástic se přemísťuje do lymfatických uzlin. Dokonce inhalované nanočástice mohou migrovat do krevního oběhu. Také mají větší oxidační schopnosti podporující a způsobující zánětlivé procesy. Z tohoto důvodu je preferováno zvlákňování polymerů rozpustných ve vodě, kde nehrozí takové nežádoucí účinky a případná toxicita. Mezi vodorozpustné polymery patří i poly-(vinylalkohol), o kterém bude více pojednáno dále.[25,30].

## 1.5 Trend ve výzkumu a vývoji nanomateriálů

V následující kapitole bude stručně popsán dosavadní výzkum nových materiálů nebo aplikací pro povrchové úpravy, které vykazují antibakteriální aktivitu.

Ve studii [29] se Beklemyshev a kol. zabývají vývojem a použitím nanokompozitů založených na různých netoxických biokompatibilních sorpčních materiálech, jako jsou přírodní a syntetické polymery či jílů za použití biologicky aktivních kovů a kovových iontů, jako jsou stříbro, měď a zinek. Tyto kovy nebo jejich ionty jsou následně upraveny a vpraveny do zmíněných struktur metodou interkalace, což označuje proces, při kterém je molekula, označovaná jako „host“ umísťovaná do „hostitelské“ mřížky. Takto upravené materiály mají široké spektrum použití od medicínských aplikací přes kosmetiku a hygienické pomůcky až k textilním materiálům s antibakteriální účinností, nebo biocidním nátěrům či povlakům, založené na principech nanotechnologie a metodách výzkumu nanomateriálů. Studie vyzdvihuje vysokou účinnost nanosystémů, založených na bázi přírodního jílovitého minerálu, do jehož struktury jsou vloženy kovové ionty. Tyto nanosystémy lze dále zpracovat do textilních výrobků, jako jsou přírodní a umělé kůže, netkané textilie, medicínské aplikace jako například ortopedické pomůcky, a jiné hygienické a kosmetické výrobky. Charakteristickou vlastností přirozené struktury nanočástic z

přírodního jílu je schopnost uvolnit volný kationt kovu, například stříbra, do okolního prostředí. Ten se současně stává sorbentem toxických látek z patogenních mikroorganismů.

Výsledky ukazují, že tento přístup je efektivní, dobře zpracovatelný a bezpečný. Sorpční materiály mohou být ve formě prášku, vláken či vysoce porózních materiálů. Je možné dodat antibakteriální aktivitu do sorpčních materiálů, které přicházejí do styku s povrchem rány, což je užitečné zejména ve zdravotnictví. Preventivní, hygienické a lékařské přípravky vyvinuté na základě výše zmíněného principu, jsou méně toxické než komplexy stříbra, mědi nebo soli, a v mnoha případech mají lepší antibakteriální účinnost a jsou lépe zpracovatelné, než například stříbrná sůl, preparáty z koloidního stříbra pro které je možné uvést skutečnost, že při jejich výrobě „je efekt  $\text{Ag}^+$  částečně potlačen v souvislosti se shlukováním koloidních částic s nečistotami rozpuštěnými ve vodě. [29,30]

Antibakteriální, baktericidní vlastnosti biologicky aktivních kovů – biokovů (stříbro, měď, zinek, atd.) ve formě solí komplexů koloidních částic jsou lidstvu dobře známé. Vědci z USA [31] například představili nový komplex antibakteriálního nanosystému s antibakteriálními i antivirovými účinky, který je založen na kovových oxidech nebo na sloučeninách oxidů, jako jsou oxid titaničitý ( $\text{TiO}_2$ ), oxid zirkoničitý ( $\text{ZrO}_2$ ), oxid cíničitý ( $\text{SnO}_2$ ), oxid zinečnatý ( $\text{ZnO}$ ) a oxid křemičitý ( $\text{SiO}_2$ ). Tyto sloučeniny byly v jejich studii funkcionalizovány organickými nebo organometalickými molekulami umožňujícími spojit ionty přechodových biokovů jako jsou  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Cu}^{2+}$ . Takovéto nanosystémy s antibakteriálními a anti-virotickými účinky mohou být použity pro výrobu lékařských a nelékařských prostředků, jako složky přidávané do krémů a jiných dermatologických výrobků. Ale i pro antibakteriální úpravu, kterou je možné použít pro různé druhy povrchových úprav a krycích nátěrů. [31,32]

### 1.5.1 Prokázané antibakteriální vlastnosti oxidů

Antibakteriální aktivita oxidu titaničitého byla prokázána v mnoha studiích [33-36] a je známá už od roku 1985, kdy byla prezentována ve studii Matusunga [37]. Unikátní vlastností nanočástic  $\text{TiO}_2$  je jejich fotokatalytická aktivita. Bylo ověřeno, že i velmi tenké vrstvy  $\text{TiO}_2$  nanesené na různý materiál i po osvětlení běžnými zářivkami vykazují antibakteriální aktivitu, a tím zajišťují, že je daný povrch zcela zbaven bakterií, mikroskopických hub a virů. Tyto výsledky umožňují nový přístup k udržování desinfikovaných povrchů. [38]

Studie [39] dokázala, že ZnO nanočástice vykazují výraznější antibakteriální efekt proti gram-pozitivním bakteriálním kmenům (např. *S. aureus*) než gram-negativním (např. *E. coli*). I další studie potvrzuje zjištěné, neboť ve studii [40] mezi sebou porovnávali antibakteriální aktivitu nanočástic ZnO, CuO a Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Nejlepší antibakteriální účinnost vykazovaly nanočástice ZnO opět vůči gram-pozitivním bakteriálním kmenům (*S. aureus* a *B. subtilis*).

Studie [41] prokázala významný antibakteriální efekt ZnO vůči bakteriálním kmenům *Listeria monocytogenes* a *Salmonella enteritidis*. Výsledky ukazují, že antibakteriální účinek ZnO nanočástic může být bakteriostatický nebo baktericidní, v závislosti na koncentraci. Jednou z nevýhod je, že ve vodných roztocích inklinují nanočástice ZnO k aglomeraci do shluků, příčinou je hydrofobní charakter ZnO. Tato vlastnost negativně ovlivňuje antibakteriální účinnost, protože shluky brání interakci s povrchem buněčné stěny. Tento nežádoucí efekt může být potlačen použitím vhodných povrchově aktivních látek, které aglomeraci ZnO nanočástic v roztocích omezí či zabrání. [41,42]

Antibakteriální aktivita ZrO<sub>2</sub> nanočástic byla vyšetřována ve studii [43], kde byly testovány bakteriální kmeny *E. coli*, *S. aureus* a houby kmene *Aspergillus niger*. Nanočástice ZrO<sub>2</sub> byly syntetizovány s různými aminokyselinami hydrotermální metodou. Antibakteriálním testováním bylo zjištěno, že ZrO<sub>2</sub> vykazuje aktivitu pouze proti *E. coli*, oproti tomu komplexy Zr vykazují antibakteriální aktivitu jak proti bakteriálním kmenům *E. coli*, tak i proti kmenu *S. aureus* plísním. Výsledky svědčí o skutečnosti, že rozdíl v antibakteriální účinnosti může být způsoben různým tvarem atomového uspořádání krystalů.

Studie [44] se zabývala vývojem SnO<sub>2</sub> vrstvou určenou pro skleněné povrchy. Vědci uvádějí, že se nechali inspirovat přírodou a výslednou vrstvu SnO<sub>2</sub> označují jako biomimetický film. Autoři film charakterizují jako odolný proti vysokým teplotám, průhledný, tenký a homogenní. Bylo prokázáno, že SnO<sub>2</sub> film je fotoaktivní, a též vykazuje antibakteriální aktivitu.

Autoři uvedených studií se shodují, že existuje několik společných faktorů, které ovlivňují proces antibakteriálního působení nanočástic oxidů TiO<sub>2</sub>, SnO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub> a ZnO na buněčnou stěnu, a do těchto faktorů patří zejména morfologie nanočástic, (měrný povrch,

povrchový náboj, rozpustnost a míra agregace nanočástic v konkrétním systému). Dalšími faktory jsou: 1) přítomnost reaktivní formy kyslíku, 2) pH prostředí 3) nutnost proniknutí nanočástic do buňky a narušení buněčné stěny.

Co se týče nanovláknenných struktur, tak Azad a kol. ve své studii [45] dokázali, že lze metodou elektrostatického zvlákňování vyrobit kompozitní nanovláknenu titanovou vrstvu. Autoři vycházeli z faktu, že je titan již dlouhou dobu používán v ortopedických implantátech, kde vykazuje výborné mechanické a antibakteriální vlastnosti. Připravováno bylo několik typů kompozitů lišících se poměrem jednotlivých chemických složek. Jako prekurzor byl použit polyvinyl-pyrrolidone a dusičnan titaničitý. Celý proces zahrnoval několik kroků a to přípravu anorganického roztoku, následovala tvorba gelu a jeho hydrolyza, elektrostatické zvlákňování polymerního roztoku a na závěr odstranění organických zbytků rozpouštědel z vláken pomocí vysokých teplot. Vyrobená vlákna byla následně analyzována pomocí TEM, SEM, XRD a EDS. Proces výroby titanových nanovláknenných byl v tomto případě úspěšný, i když některá vlákna vykazovala koráلكové defekty a je tedy nutné dále optimalizovat složení zvlákňovaného roztoku.

Pokud jde o výběr antibakteriálního polymeru, pak byla zkoumána antibakteriální aktivita nanostruktur z chitosanu a jeho derivátů. Jeho širokou antibakteriální efektivitu prokázali autoři studie [46]. Mechanismus antibakteriálního působení chitosanu je spojován s interakcí kation-aktivního chitosanu s anion-aktivní buněčnou membránou, kdy zvětšující se propustnost membrány, může eventuálně dojít až k jejímu prasknutí a tím k úniku intracelulární tekutiny z buňky. Dále bylo potvrzeno, že chitosan ve formě nanočástic vykazuje lepší antibakteriální aktivitu než chitosan bez nanorozměrů. Tato skutečnost je jednak přičítána velkému povrchu nanočástic a jednak množství elektrického náboje na jednotku plochy. Tyto faktory způsobují silnější interakci s povrchem bakteriální buňky.

Některé další studie se zaměřily na zkoumání antibakteriálních vlastností nanostruktur kombinujících chitosan s dalším antibakteriálním činidlem. Li a kol. ve své práci [47] testovali film na bázi chitosanu obsahující ZnO a Ag nanočástice. Výsledky ukazují, že tento nanokompozitní film, vykazuje větší a širší spektrum antibakteriální účinnosti, než nanokompozitní film obsahující pouze jeden druh nanočástic. Ve studii [48], Wang a kol., vyvíjeli nanovláknena na bázi chitosanu a ZnO. Nanočástice ZnO byly přidány do roztoku chitosan/polyvinylalkohol (CH/PVA). Z tohoto roztoku byly připraveny metodou elektrostatického zvlákňování nanovláknena. Pro antibakteriální testování byla použita metoda

zjišťování MIC (minimální koncentrace účinné látky, která zabraňuje růstu bakterií). MIC nanovláknenného kompozitu byla testována zvlášť oproti bakteriálnímu kmenu *E. coli* a *Candida albicans* (*C. albicans*). Růst bakteriálního kmene *E. coli* byl kompletně inhibován při koncentraci ZnO 110 µg/mL, a při koncentraci 160 µg/mL pro kmen *C. albicans*. Bylo prokázáno, že přítomnost nano-ZnO přispěla k antibakteriální aktivitě chitosanu. Antibakteriální účinky chitosanu se ZnO jsou přisuzovány sekvencí účinků, jakými jsou: přilnavost nanovláken k buněčným stěnám způsobené elektrostatickými účinky nanovláken, změna na povrchu buněčné stěny denaturací bílkovin a změnou propustnosti buněčné stěny, narušením buněčné stěny pomocí reaktivních forem kyslíku vyvolaných přítomností ZnO.

Z výše popsaných studií vyplývá, že trendy v oblasti antibakteriálních úprav pomocí nanočástic a nanomateriálů jsou v posledních letech na svém vrcholu. Důvodem je vyšší účinnost úprav. Co se týče typu antibakteriálních úprav, víceméně se výzkum odvíjí od nanočástic typu ZnO, TiO<sub>2</sub>, SnO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub> a to s ohledem na jejich dostupnost, snadnou modifikaci a pro jejich netoxický charakter ve vztahu k lidským tkáním. Hlavním trendem v této oblasti je právě směr vyhledávající materiály netoxické a biomimetické. Co se týče antibakteriálního typu polymeru, tak ve více pracích byl zmiňován chitosan, který dosahoval ve všech případech vysokých antibakteriálních účinků a to už i bez nutnosti přidání dalších antibakteriálních aditiv.

Z výše popsaných důvodu se diplomová práce zabývá vývojem nanovláknenné membrány s obsahem aditiv, která bude antibakteriální, netoxická, a zároveň bude možné ji aplikovat v medicínských krycích materiálech, obvazech apod. Léčebné přípravky se antimikrobiálními ionty, aplikované v současné době ve formě koloidních roztoků a gelů, jsou efektivní při léčení infikovaných ran, kde je prvořadé potlačení patogenních mikroorganismů. Následně je žádoucí, aby produkt byl snadno odstranitelný bez poškození hojící se tkáně, a aby přispíval ke zrychlení procesu uzdravení rány. Z toho důvodu, antibakteriální materiál ve formě nanovláknenné membrány by byl jistě žádoucí.



---

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experiment je rozdělen do několika po sobě logicky jdoucích kroků. V první fázi byly připravovány polymerní roztoky s přídavkem antibakteriálních nanočástic. První skupinu tvoří polymerní roztok PVA s antibakteriálními složkami  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{TiO}_2$  a  $\text{SnO}_2$ . Do roztoků PVA byly jednotlivé antibakteriální složky přidávány v hmotnostních koncentracích 1, 5 a 10hm.%. Druhou skupinu tvoří polymerní roztok na bázi chitosan/polyethylenoxid (CH/PEO) do kterého se rovněž přidávala uvedená antibakteriální aditiva.

Dalším krokem bylo polymerní roztoky s antibakteriálními přísadami v jednotlivých koncentracích elektrostaticky zvláknit. Bylo nutné zvláknit i polymerní roztoky bez přidané antibakteriální složky, které sloužili jako referenční vzorky při vyhodnocování vlivu jednotlivých antibakteriálních složek. V diplomové práci byly antibakteriální nanočástice inkorporovány do nanovláknenné membrány internálně, tzn., že nanočástice byly přidány přímo do polymerního roztoku, který byl následně elektrostaticky zvlákněn.

Dále byl testován externální způsob inkorporace, kdy nebyly antibakteriální nanočástice inkorporovány přímo do zvláknovacího roztoku, ale byly do nanovláknenné membrány dodávány externě během procesu elektrostatického zvláknování čistého polymerního roztoku rozfukováním.

Další fáze byla analýza všech připravených nanovláknenných membrán pomocí metody SEM a EDS pro zjištění distribuce antibakteriálních složek uvnitř membrán.

Na závěr experimentu byly vzorky testovány, co se týče antibakteriální účinnosti. Očekáváním bylo zhodnotit, která z metod inkorporace nanočástic do nanovláknenné membrány je nejúčinnější, který z uvedených oxidů má nejvyšší antibakteriální účinnost vůči bakteriím *E. Coli* a *S. Aureus*. Na závěr bylo potřebné zjistit, který z použitých polymerů je více antibakteriální.

### 2.1 Použité chemikálie

V této kapitole budou stručně charakterizovány všechny chemikálie a zejména antibakteriální aditiva, která byla v experimentech použita.

### 2.1.1 Polyvinylalkohol

PVA je syntetický polymer. Patří do skupiny vinylových polymerů. Jedná se o bílý krystalický prášek, více či méně rozpustný v polárních rozpouštědlech. Rozpustnost je závislá na stupni krystalinity. Je velmi dobře vláknotvorný a vlákna z PVA jsou pružná a odolná. Je biokompatibilní a biodegradabilní, proto se často využívá ve zdravotnictví například při výrobě chirurgických nití, nebo pro prostředky ke krytí ran.

V experimentu byl použit PVA od firmy Sloviol. V rámci elektrostatického zvlákňování se jako rozpouštědlo pro PVA použila destilovaná voda, takže výsledný polymerní roztok by měl být zcela netoxický. [49,50]

### 2.1.2 Chitosan

Chitosan je biosyntetický polysacharid, který se skládá z kopolymeru glukosamin ( $\beta(1-4)$ -2-amino-2-deoxy-D-glukosa) a N-acetylglukosaminu (2-acetamid-2-deoxy-D-glukosa). Získáván je převážně deacetylací z látky chitin která je získávána ze schránek korýšů a krabů. Termínem chitosan se označuje polymer s různou molekulovou hmotností od 50 do 2000 kDa, různou viskozitou a stupněm deacetylace obvykle 40-98 %, oproti chitinu. [4] V roztocích kyselin nese pozitivní náboj díky protonizované amino skupině. V medicíně má chitosan všestranné využití jako bioadhezivo, podporuje léčbu zranění, je možné ho využít ve tkáňovém inženýrství, pro kontrolovaný transport léčiv a je využíván i jako součást hydrogelů.[51]

V experimentu byl použit nízkomolekulární chitosan od firmy Wako. Stupeň deacetylace je minimálně 80%, viskozita roztoku 5g/l, při 20 °C přibližně 10 mPa.s. V rámci elektrostatického zvlákňování se jako rozpouštědlo použil vodný roztok 10%-ní kys. citrónové.

### 2.1.3 Polyethylenoxid

Jedná se o bílý, tuhý polymer voskovitého nebo parafínového vzhledu v závislosti na molární hmotnosti může být i v kapalné formě. Je chemicky inertní a netoxický. Je rozpustný ve vodě i v organických rozpouštědlech, není rozpustný v alkoholu. V chemii má PEO velký význam. Ve farmacii se používá jako nosič, lubrikant, nebo protipěnicí přísada a jako potahová součást v tabletách.

Pro přípravu roztoku byl použit PEO od firmy Sigma-Aldrich, s molekulovou hmotností  $9 \times 10^5$  g/mol. Viskozita 5%-ního roztoku PEO rozpuštěného ve vodě při teplotě 25 °C dosahuje 8 800-17 600 mPa.s., teplota tání je 65 °C a udávaná hustota  $1210 \text{ kg/m}^3$ . [52]. V rámci elektrostatického zvlákňování se jako rozpouštědlo použila destilovaná voda s přídavkem NaCl pro zvýšení elektrické vodivosti roztoku. [52]

#### 2.1.4 Kyselina citrónová

Jedná se o tri-karboxylovou kyselinu. Přirozeně se vyskytuje v citrusových plodech. Kyselina citronová je krystalická látka, je velmi dobře rozpustná ve vodě a v ethanolu. Má široké využití především v potravinářství, ale i v kosmetice, a farmacii. V lidském organismu je kyselina citronová biochemicky velmi významná.

Pro experiment byla pro rozpuštění chitosanu použita 10 %-ní kyselina citrónová od firmy NCHZ, a.s. Molární hmotnost kyseliny je  $192,13 \text{ g/mol}$  a hustota  $1,665 \text{ g/cm}^3$ . [53]

#### 2.1.5 Triton X-100

Povrchově aktivní látka Triton X-100 byl použit pro snížení povrchového napětí roztoků při elektrostatickém zvlákňování. Chemicky lze Triton X-100 zařadit mezi oktylfenoly ethoxyláty. Triton X-100 je rozpustný ve vodě, ale i v různých organických rozpouštědlech. Molekulová hmotnost kapalného Tritonu X-100, použitého při experimentech je  $646.85 \text{ g/mol}$  a hustota  $1,07 \text{ g/cm}^3$ . V průmyslu je široce využíván. Nejvýznamnější je jeho použití jako neionogenního tenzidu a stabilizátoru. [54,55]

Pro experimenty byl použit Triton X-100 od firmy Acros Organics.

#### 2.1.6 Chlorid sodný

V přírodě se vyskytuje v podobě nerostu halitu. Je to bílá, skelně lesklá látka slané chuti. Jedná se o důležitou sloučeninu s rozsáhlým využitím zejména v potravinářském a chemickém průmyslu. Ve vodě se dobře rozpouští, nasycený roztok vznikne rozpuštěním  $35,7 \text{ g NaCl}$  ve  $100 \text{ g}$  vody při 20°C.

V experimentu byl pro zvýšení elektrické vodivosti roztoku použit chlorid sodný od společnosti Lachema. Udávaná hustota je  $2,163 \text{ g/cm}^3$ . [56]

### 2.1.7 Síťovací činidla

Jelikož jsou PVA nanovláknenné membrány po elektrostatickém zvlákňování rozpustné ve vodě, je potřeba je chemicky zesíťovat a tím jejich rozpustnosti zamezit nebo ji snížit. Pro síťování PVA byly použity následující chemikálie:

#### Glyoxal

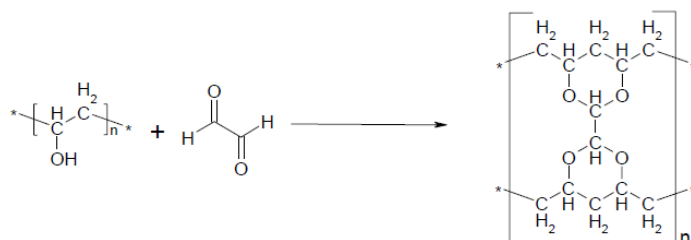
Glyoxal je označení pro organickou sloučeninu obsahující v molekule dvě aldehydické skupiny. Chemický vzorec je  $\text{COHCOH}$ . Glyoxal je žlutá kapalina nebo krystalická látka ostrého zápachu. Je významný jako síťovací prostředek v polymerní chemii, pro povrchové úpravy v papírnictví a pro zušlechťování textilu a například pro nemačkové úpravy.

Pro experiment byl použit 40%-ní roztok od firmy Sigma-Aldrich. [57]

#### Kyselina fosforečná - $\text{H}_3\text{PO}_4$

Pro zahájení síťovací reakce mezi PVA a glyoxalem bylo nutné použít katalyzátor  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Za normálních podmínek je kyselina fosforečná bezbarvá, čirá a tvoří kosočtverečné krystaly. Na vzduchu se roztéká a tvoří sirupovitý vodný roztok obsahující 83-90%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Jedná se o středně silnou kyselinu, je stálá a nemá oxidační vlastnosti. Využívá se také v potravinářství při výrobě nealkoholických nápojů, sýrů a tuků. [56]

Průběh chemické reakce síťování PVA je znázorněn na obr. 10. Hydroxylové skupiny PVA reagují s dialdehydy glyoxalu za vzniku acetalových vazeb.



Obr. 10. Síťovací reakce PVA, převzato z [58]

---

## 2.1.8 Antibakteriální aditiva

Důležitou složkou zvláknovacích roztoků byly následující sloučeniny:

### Oxid zinečnatý

Oxid zinečnatý je za běžných podmínek bezbarvá krystalická sloučenina. V přírodě se vyskytuje jako zinková ruda – zinkit. Je nerozpustný ve vodě. Oxid zinečnatý má široké využití. Čistý se také používá v kosmetice k přípravě pudrů, past a mastí v lékařství. [56]

Pro experiment byl použit oxid zinečnatý ve formě nanočástic od firmy Sigma-Aldrich. Molekulová hmotnost je 81,39 g/mol , velikost nanočástic je <100 nm, hustota je 5,61 g/cm<sup>3</sup> při 25 °C. [59]

### Oxid titaničitý

Oxid titaničitý je bílá pevná sloučenina. V přírodě se vyskytuje ve třech polymorfních modifikacích, z nichž nejstabilnější je rutil. Díky svým vlastnostem má velmi široké využití, např. je používán pro výrobu tenkých povlaků ve speciální optice, v kosmetice a farmacii. V medicíně se používá jako implantačního materiálu pro umělé klouby. TiO<sub>2</sub> má schopnost fotokatalýzy a takto upravené povrchy mají pak dezinfekční a samočistící schopnosti. [45]

V experimentu byl použit krystalický oxid titaničitý ve formě nanočástic od firmy Sigma-Aldrich s molekulovou hmotností 79,87 g/mol , velikost nanočástic je <100 nm a hustota při 25 °C je 4.26 g/cm<sup>3</sup>. [60]

### Oxid zirkoničitý (ZrO<sub>2</sub>)

Oxid zirkoničitý je bílá krystalická sloučenina. Ve vodě je nerozpustný. Jako bílý pigment je vhodný k výrobě smaltů a keramiky. Při vyšších teplotách je elektricky vodivý a je možné jeho použití jako tuhého elektrolytu nebo jako elektrolytu pro palivové články. [57]

V experimentu byly použity nanočástice oxidu zirkoničitého ve formě nanočástic od firmy Sigma-Aldrich s molekulovou hmotností 123,22 g/mol , velikost nanočástic je <100 nm s hustotou je 5.89 g/cm<sup>3</sup> při 25 °C. [61]

### **Oxid cíničitý ( $\text{SnO}_2$ )**

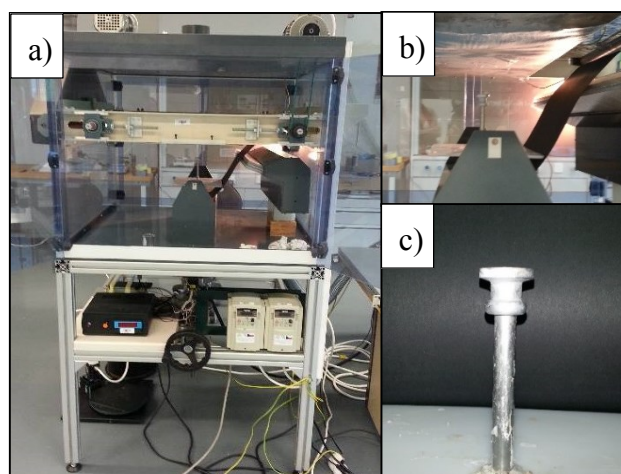
Oxid cíničitý je bílá bezbarvá sloučenina. Není rozpustný ve vodě, pouze v silných kyselinách a zásadách. Je diamagnetický a má amfoterní charakter. Má antistatické účinky. Často je též používán pro leštění drahých kamenů. Dále se oxid cíničitý stále častěji využívá jako senzor pro hořlavé plyny. [56]

V experimentu byl použit oxid cíničitý ve formě nanočástic od firmy Sigma-Aldrich s molekulovou hmotností 150.71 g/mol, velikost nanočástic je  $<100$  nm s hustotou je 6.95 g/cm<sup>3</sup> při 25 °C. [62]

## **2.2 Použitá zařízení**

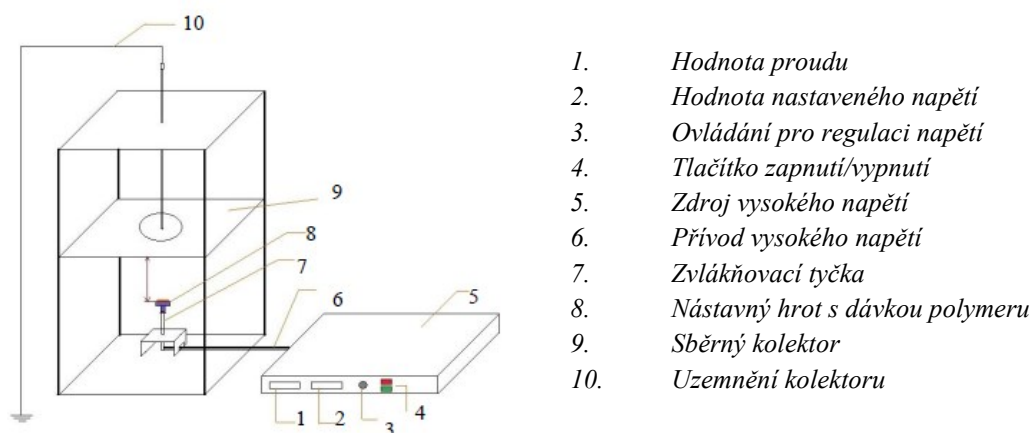
### **2.2.1 Zařízení pro elektrostatické zvlákňování**

Hlavní část experimentu – elektrostatické zvlákňování, bylo realizováno na zařízení, jehož jedna zvlákňující elektroda je tvořena nastavnou tyčkou, na kterou lze umístit přídatný hrot, viz obr. 18. c). Zařízení se nachází v laboratořích budovy CxI Technické univerzity v Liberci.



*Obr. 11. Zařízení pro elektrostatické zvlákňování: a) celkový pohled, b) detailní obrázek průběhu elektrostatického zvlákňování, c) detailní obrázek nastavného hrotu*

Jak již bylo zmíněno v teoretické části této práce, výsledný charakter vytvořené nanovláknenné vrstvy závisí na řadě parametrů. Pro zvlákňování polymerních roztoků byl použit nastavný hrot a to z důvodu nanesení většího objemu zvlákňovaného roztoku a tím větší intenzity zvlákňovacího procesu a tvorby větší plochy zvlákněné vrstvy na podkladovou textilií. Nastavný hrot je zobrazen na obrázku 11. c). Schéma zařízení pro elektrostatické zvlákňování pak na obr. 12.



Obr. 12. Schéma laboratorního zařízení pro elektrostatické zvlákňování, převzato z [61]

Příprava nanovláknenné membrány a antibakteriálními účinky byla realizována dvěma způsoby inkorporace antibakteriálního aditiva: internální (aditivum je součástí zvlákňovacího roztoku) a externální (aditivum je dodávané až v průběhu elektrostatického zvlákňování). Dle předchozích zkušeností byly parametry zvlákňování nastaveny na: vzdálenost elektrody a sběrného kolektoru 10 cm a elektrické napětí 50 kV. Zvlákňování probíhalo za laboratorních podmínek, teplota vzduchu  $21 \pm 1$  °C a vlhkosti  $60 \pm 1$  %.

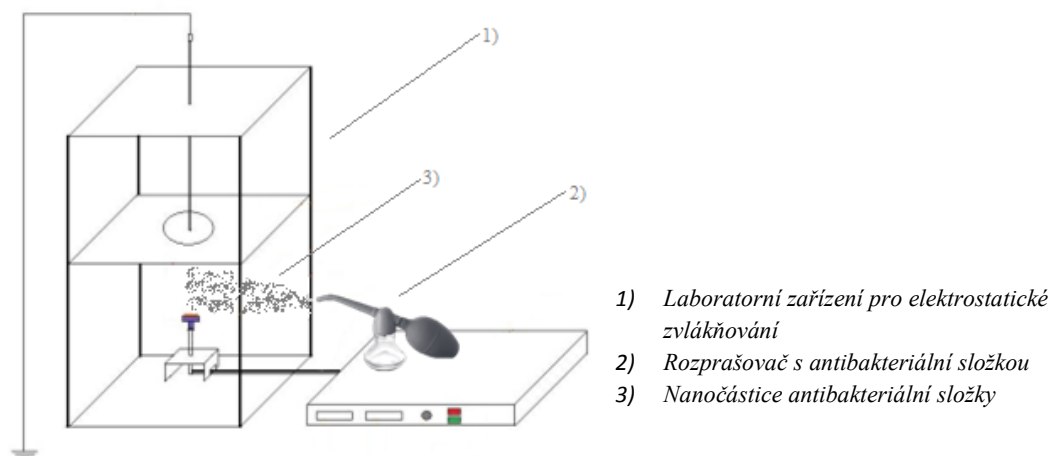
### 1) Internální způsob inkorporace nanočástic do nanovláknenné membrány

Nejprve byly nastříhány jednotlivé pruhy podkladové vrstvy, tvořené polypropylenovou netkanou textilií typu Spun-bond. Tato podkladová vrstva byla umístěna na horní část sběrného kolektoru. Následně byl na kovovou tyčku nasazen nastavný hrot, na který bylo nanесeno množství 1,5 ml zvlákňovacího roztoku. Poté co se celé množství 1,5 ml roztoku a antibakteriální aditivы zvláknilo na podkladovou vrstvu, vrstva se odebrala a celý proces se opakoval s dalším polymerním roztokem (koncentrací/antibakteriální

přísadou). Na závěr bylo nutné zvláknit polymerní roztok bez antibakteriální složky, který sloužil jako referenční vzorek.

## 2) Externální způsob inkorporace nanočástic do nanovláknenné membrány

Stejný průběh i stejné parametry elektrostatického zvláknění byly nastaveny také v případě, kdy byla antibakteriální aditiva přidávána do nanovláknenné membrány externálně. Odměřené množství antibakteriálního aditiva bylo vsypáno do ručního rozprašovače značky DeVilbiss HealthCare. V průběhu zvláknění 1,5 ml čistého polymerního roztoku byla antibakteriální složka dodávána do membrány rozfukováním pomocí gumového míčku v rozprašovači. Rozprašovač byl umístěn mezi hrot s roztokem a kolektorem, co nejbližší, tak aby ještě nehrozil zásah vysokým napětím. Ilustrativní schéma externího dodávání antibakteriální složky do membrány je znázorněno na obr. 13.



Obr. 13. Schéma pro externí způsob inkorporace antibakteriální složky

Pro snížení rozpustnosti nanovláknenných membrán ve vodě, byly vzorky se síťovacími činidly po zvláknění umístěny do horkovzdušné trouby po dobu 30 minut při 120 °C. Síťovací činidla a působení vysoké teploty vyvolaly reakci makromolekulárních řetězců polymeru za vzniku příčných vazeb, kterými se řetězce spojily do prostorové sítě.

Poté byly vzorky rozstříhány a popsány pro jednotlivá testování. Pro antibakteriální testování bylo zapotřebí vzorky o velikosti 25 x 50 mm (metoda AATCC 147 – 2004) a 18 x 18 mm (metoda AATCC 100 – 2004). Velikost vzorků pro EDS analýzu byla přibližně 5 x 5 mm.



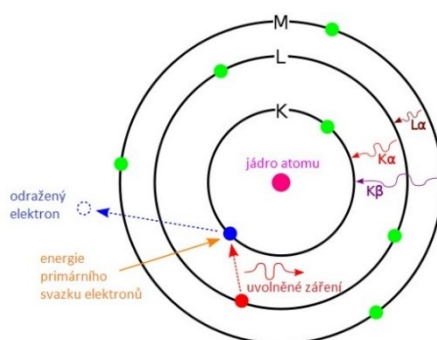
## 2.3 Použité testovací metody

### 2.3.1 Rastrovací elektronový mikroskop (SEM)

SEM je přístroj pro nedestruktivní pozorování nejrůznějších struktur a povrchů vzorků. Primární elektrony jsou emitovány ze zdroje, většinou rozžhavené wolframové katody, a urychleny pomocí rozdílného potenciálu mezi anodou a katodou. Primární svazek elektronů se pohybuje zpravidla po řádcích preparátu. Tvorba obrazu je založena na interakci primárního svazku s povrchem preparátu. Tato interakce přináší informace o fyzikálních a chemických vlastnostech zkoumaného preparátu. Zvětšení pozorovaného vzorku se pohybuje řádově v rozmezí  $10^2 - 10^5$ . Kvalita výsledného obrazu závisí na volbě urychlovacího napětí. Celý vnitřní prostor tubusu a komory s preparáty je zaplněn vakuem nebo se dá použít sníženého tlaku 0,1 – 6 kPa, za použití inertního plynu, např. dusíku. [M,P,Q,R]

### 2.3.2 Energiově disperzní spektroskopie (EDS)

Princip EDS je založen na interakci svazku primární elektronů dopadajících na povrch vzorku a vzorku samotného. V průběhu procesu vzniká rentgenové (RTG) záření. Charakteristické RTG záření prvků vzniká, pokud jsou zásahem primárních elektronů vyraženy jednotlivé elektrony z vnitřních vrstev atomu (K, L, M), vznikají tak prázdná místa, která jsou nahrazena elektrony z vyšších energetických hladin, a rozdíl energie je uvolněn ve formě záření viz obr. 14. Toto RTG záření je pro každý prvek charakteristické a je měřeno pomocí polovodičových spektrometrů. [Q,U]



Obr. 14. Schéma EDX, převzato z [62]

Všechny snímky byly pořízeny mikroskopem ULTRA PLUS od firmy Carl Zeiss STM AG, umístěným v laboratoři Elektronové mikroskopie na katedře materiálu, Fakulty

strojní Technické univerzity v Liberci. Rastrovací elektronový mikroskop je vybaven EDS detektorem typu X-Max 20 a pracuje se software Smart SEM Version 5.05, AZtec 2.1. Snímky byly pořízeny v inertní atmosféře za přítomnosti dusíku, bez pokovení.

## 2.4 Testování antibakteriálních vlastností

Antibakteriální vlastnosti vzorků byly testovány v laboratoři pro Medicínské aplikace v budově CxI Technické univerzity v Liberci. Testy byly provedeny konkrétně testovací metodou AATCC 100 a AATCC 147 popsanou níže.

### 2.4.1 Testovací metoda AATCC 147 – 2004

Jedná se pouze o kvalitativní metodu a je zde hodnocena zóna zábrany růstu bakterií - halo zóna (inhibiční zóna). Halo zóna je hodnocena podle rovnice (1):

$$W [mm] = (T - D)/2 \quad (1)$$

Kde W je šířka čisté zóny tlumení bakteriálního růstu v mm, T je celkový rozměr testovaného vzorku a čisté zóny tlumení růstu bakterií a D značí rozměr testovaného vzorku v mm. Test probíhal se stejnými bakteriálními kmeny jako v předešlém případě a to s E. coli a S. aureus. Tyto bakteriální kmeny o koncentraci  $10^5$  CFU/ml a objemu 1 ml byly vyočkovány na misky s krevním agar. Do misek s bakteriálním inokulem byly poté vloženy nanovlákněné membrány (o rozměru 25 x 50 mm). Inkubace vzorků probíhala 24 hodin při teplotě 37 °C. Poté byla na jednotlivých miskách zjišťována přítomnost halo zóny a případně změřena její šířka.

### 2.4.2 Testovací metoda AATCC 100 – 2004

Testovací metoda AATCC 100-2004 je kvantitativní metoda, při které se hodnotí procento redukce bakterií podle vzorce (2):

$$R [\%] = 100 * (B - A)/B \quad (2)$$

Přičemž A je upravený vzorek, a B je referenční (neupravený) vzorek. Výsledkem je počet znovu obnovených bakteriálních kolonií. V tomto případě byly použity patogenní bakteriální kmeny: E. coli a S. aureus. Počáteční koncentrace bakteriální směsi byla  $10^5$  CFU/ ml. Vzorky nanovlákněných membrán (o rozměru 18 x 18 mm) byly umístěny do kontejnerů (malá uzavíratelná plastová nádobka). Následně byl každý kontejner naočkován

10 µl bakteriální suspenzí. Takto připravené suspenze se nechaly inkubovat po dobu 24 hodin při 37 °C. Následující den byly suspenze zředěny 10 ml fyziologického roztoku (rozpuštění 8,5 g NaCl v 1000 ml destilované vody), následně vortexovány a 1 ml byl vyočkován na misky, a opět se nechaly inkubovat 24 hodin při 37 °C. A následně byly spočítány bakteriální kolonie na jednotlivých miskách (hodnota A), přičemž hodnoty bakteriálních kolonií spočítaných na referenčním vzorku udávají hodnotu B. Následně byla vypočítána inhibiční účinnost.

## 2.5 Optimalizace polymerního roztoku pro přípravu nanovláknenné membrány

### 2.5.1 Membrána na bázi PVA – internální způsob inkorporace antibakteriální složky

Nejprve byly namíchány 10%-ní polymerní roztoky PVA s antibakteriálním aditivem  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{TiO}_2$  a  $\text{SnO}_2$  o koncentraci (1, 5 a 10 hm.%). Pro namíchání jednotlivých zvláknovacích roztoků s antibakteriálními aditivy bylo nejprve nutné zjistit jejich hustotu a z té vypočítat potřebné odvažované množství viz tab. 1.

Tab. 1. Hmotnost odvažovaných antibakteriálních aditiv

Antibakteriální aditivum	Hmotnost pro 1 hm.% roztok [g]	Hmotnost pro 5 hm.% roztok [g]	Hmotnost pro 10 hm.% roztok [g]
$\text{ZrO}_2$	0,100	0,500	1,000
$\text{ZnO}$	0,100	0,500	1,000
$\text{TiO}_2$	0,075	0,372	0,745
$\text{SnO}_2$	0,122	0,612	1,224

Podle údajů z tabulky 1. bylo postupně naváženo odpovídající množství PVA polymerního roztoku a antibakteriální složky (celé předpisy pro jednotlivé polymerní roztoky jsou uvedeny v příloze A). Do části zvláknovacích roztoků byla přidána povrchově aktivní látka Triton X-100, která se vmíchala o hmotnostní koncentraci 0,1% pro snížení povrchového napětí a tím usnadnění průběhu elektrostatického zvláknování.

Jednou z charakteristických vlastností PVA je jeho rozpustnost v polárních rozpouštědlech. K potlačení této nežádoucí vlastnosti je nutné do polymerních roztoků přidat i síťovací činidla a následně nanovláknennou membránu nechat za přítomnosti tepla

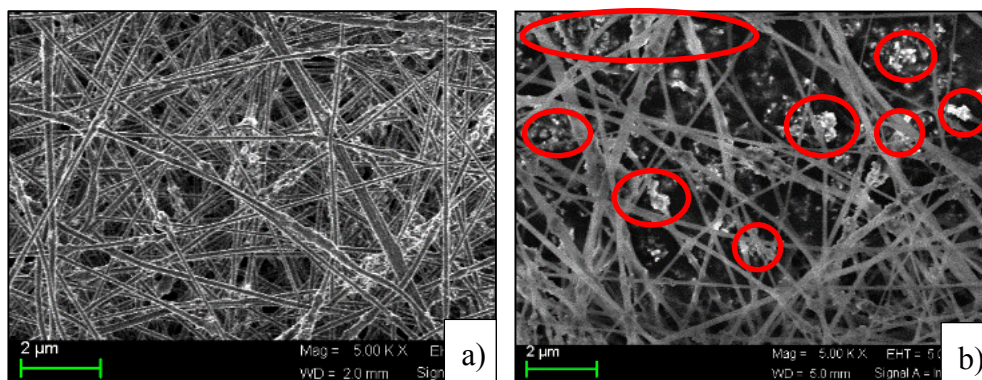
zesíťovat. V experimentu byla použita sloučenina Glyoxal a jako katalyzátor reakce kyselina fosforečná. Výsledkem této reakce je, že zesíťovaný PVA je nerozpustný ve vodě. Předpis polymerních roztoků pro výrobu PVA membrán se síťovacími činidly zůstal zachován, pouze došlo navíc k přidání 0,75 g Glyoxalu a 0,53 g kyseliny fosforečné (do 10-ti g 10%-ního polymerního roztoku PVA). Všechny komponenty se smíchaly dohromady a byly ponechány 24 hodin na elektromagnetickém míchadle a poté zvlákňovány.

## Diskuze

### A) Vliv povrchově aktivní látky

Přítomnost povrchově aktivní látky má vliv na samotný průběh elektrostatického zvlákňování. Zvlákňování roztoků bez povrchově aktivní látky probíhalo problematicky. Docházelo ke zvlákňování pouze z okrajů zvlákňovací elektrody. Navíc bylo nutné zvýšit napětí z 50 kV až k hodnotám 70 kV, aby bylo zvlákňování realizováno.

Vliv povrchově aktivní látky ve zvlákňovacím roztoku na výslednou morfologii nanovláknenné membrány lze pozorovat na níže uvedených SEM snímcích (obr. 15.). Na obr. 15. a) je membrána na bázi PVA s přidavkem povrchově aktivní látky a na obr. b) bez povrchově aktivní látky. V obou případech bylo do zvlákňovacích roztoků přidáno 10 hm.% ZnO.



Obr. 15. Vliv povrchově aktivní látky na výsledný vzhled nanovláknenných omembrán a) PVA membrána s PAL, b) PVA membrána bez PAL

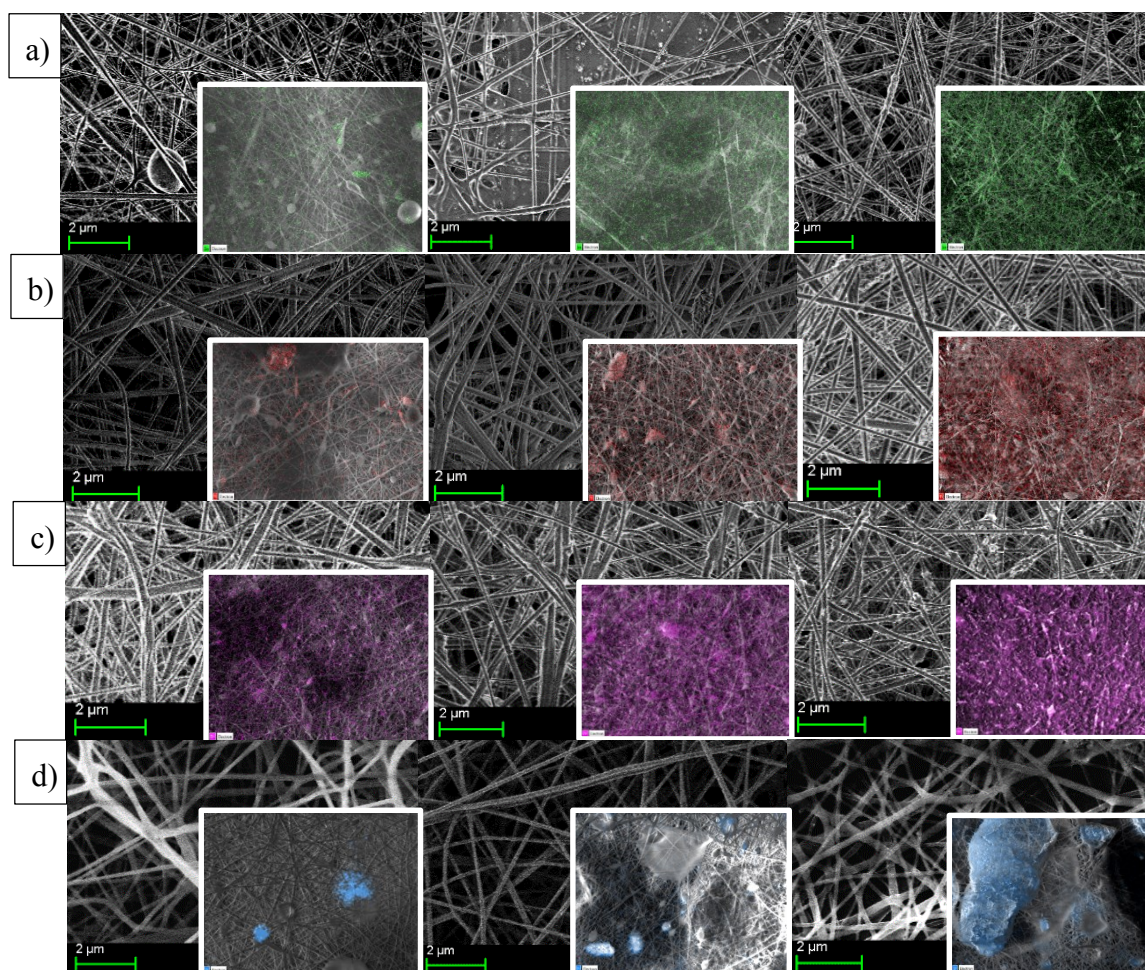
Z obr. 25 je zřejmé, že membrána s přidavkem povrchově aktivní látky má antibakteriální aditivum lépe roz distribuováno po celé délce vláken, oproti tomu v případě nanovláknenné membrány bez povrchově aktivní látky, kde jsou zřetelné shluky antibakteriálních aditiv. Na základě těchto výsledků a s přihlédnutím k průběhu



elektrostatického zvlákňování, byla povrchově aktivní látka Triton X-100 přidávána do všech následujících polymerních roztoků.

### B) Vliv zvyšování koncentrace antibakteriálního aditiva na výslednou morfologii nanovláknenných membrán

Postupně byly elektrostaticky zvlákňovány roztoky PVA s rostoucí koncentrací antibakteriálního aditiva. Na SEM snímcích na obr. 16. a) - d) lze pozorovat skutečně postupné zvyšování koncentrace jednotlivých antibakteriálních aditiv. Důvodem tohoto experimentu bylo potvrdit nebo vyvrátit skutečnost, zda antibakteriální aditivum je po elektrostatickém zvlákňování obsaženo ve výsledné nanovláknenné membráně a nezůstává například na zvlákňovací elektrodě ve zbylém polymerním roztoku. Obsah antibakteriálních aditiv v nanovláknenné membráně je znázorněn v podokně EDS analýzy snímků. Jednotlivá antibakteriální aditiva jsou reprezentována různou intenzitou barevných míst, kde byla antibakteriální složka v nanovláknenné membráně detekována.



Obr. 16. Zvyšování koncentrace antibakteriálního aditiva 1, 5 a 10hm. %: a)  $\text{SnO}_2$ , b)  $\text{TiO}_2$ , c)  $\text{ZnO}$ , d)  $\text{ZrO}_2$ .

Lze konstatovat, že v případě nanovlákných membrán s přídavkem antibakteriálních aditiv  $\text{SnO}_2$  a  $\text{TiO}_2$  na obr. 16. a) a b) se obsah antibakteriálního aditiva zvyšuje rovnoměrně a je zde patrná jejich rovnoměrná distribuce. U SEM snímků na obr. 16. c) – nanovlákná membrána s přídavkem  $\text{ZnO}$  již tak patrný rozdíl mezi jednotlivými koncentracemi nevykazovala, zejména pak mezi koncentrací 5 a 10 hm.%. Opět je zde patrná rovnoměrná distribuce antibakteriální složky. Oproti tomu u SEM snímků na obr. 16. d), nanovlákná membrána s přídavkem  $\text{ZrO}_2$ , tvoří antibakteriální aditivum shluky a jeho rozložení není rovnoměrné.

V případě, že bude porovnáván rozdíl mezi nanovláknou membránou s přídavkem antibakteriálního aditiva 1 oproti 10 hm.% lze vidět, že s nižší koncentrací jsou vlákna na povrchu hladká. To značí, že antibakteriální aditivum se nachází přímo uvnitř vláken. Oproti tomu u nanovlákné membrány s přídavkem 10 hm.% lze pozorovat drsný povrch nanovláken. Antibakteriální aditivum je uvnitř obsaženo v mnohem menší míře a spíše má tendenci aglomerovat na povrchu vláken.

### **2.5.2 Membrána na bázi PVA – externální způsob inkorporace antibakteriální složky**

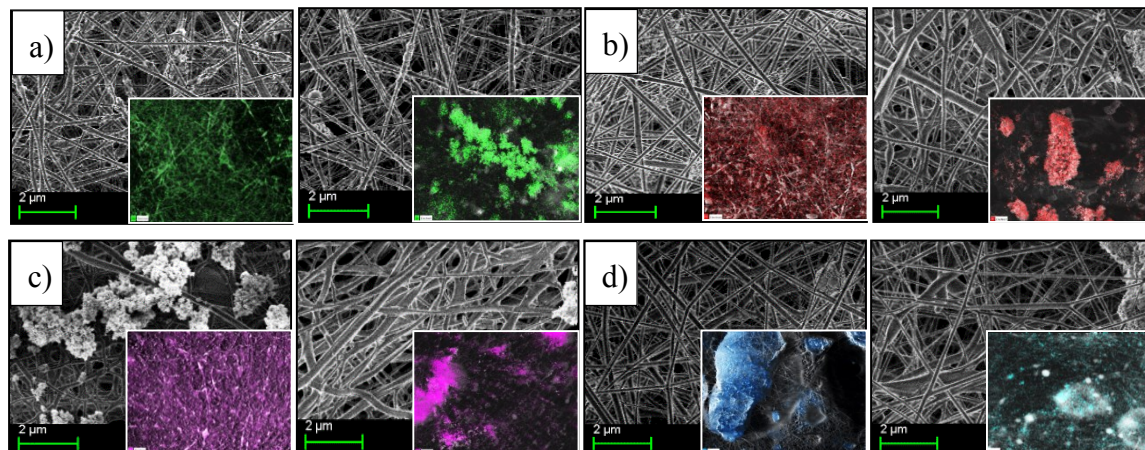
Pro externální způsob inkorporace antibakteriálních aditiv byly zvláknovací roztoky připraveny zvlášť. Nejprve byl připraven polymerní roztok tvořený jen 10%-ním PVA, a povrchově aktivní látkou Tritonem X-100, dle předpisu z tabulek uvedených v příloze A. Antibakteriální složka přidávána externálně byla přepočítána na množství 1,5 ml roztoku tak, aby odpovídala koncentraci 1, 5 a 10 hm.% dosažené internálním způsobem inkorporace. Antibakteriální složka byla navážena zvlášť dle následující tabulky 2. a jednotlivá množství byla přidávána do nanovlákné membrány až v průběhu elektrostatického zvláknování pomocí rozprašování, jak bylo uvedeno v kapitole 2.2.1

Tab.2. Hmotnost antibakteriální složky přidávané do membrány rozprašováním v průběhu elektrostatického zvlákňování

Antibakteriální aditivum	Hmotnost pro 1 hm.% roztok [g]	Hmotnost pro 5 hm.% roztok [g]	Hmotnost pro 10 hm.% roztok [g]
ZrO <sub>2</sub>	0,015	0,075	0,150
ZnO	0,015	0,075	0,150
TiO <sub>2</sub>	0,011	0,056	0,112
SnO <sub>2</sub>	0,018	0,092	0,183

### Diskuze

V případě externálního způsobu inkorporace antibakteriálních aditiv je z SEM a EDS snímků (obr. 17. a) – d) ) patrné, že aditiva byla ve všech případech na povrchu nanovlákněné membrány oproti internálnímu způsobu, kde aditiva byla rozdispergována uvnitř nanovláken po celé jejich délce. V případě ZrO<sub>2</sub>, aditiva tvořila největší shluky v porovnání se ZnO, TiO<sub>2</sub> a SnO<sub>2</sub>, kde shluky dosahovaly menších rozměrů. Naopak nejmenší shluky tvoří antibakteriální aditivum TiO<sub>2</sub> na obr 17. b). Co se týče rovnoměrnosti rozmístění antibakteriálních aditiv, lze pozorovat jednoznačně lepší výsledky u nanovlákněných membrán, kde byla antibakteriální aditiva inkorporována internálně.



Obr. 17. Porovnání SEM snímků internální (vlevo) a externální (vpravo) způsob inkorporace antibakteriálního aditiva o koncentraci 10 hm.%: a) SnO<sub>2</sub>, b) TiO<sub>2</sub>, c) ZnO, a d) ZrO<sub>2</sub>

### 2.5.3 Membrána na bázi CH/PEO – internální způsob inkorporace antibakteriální složky

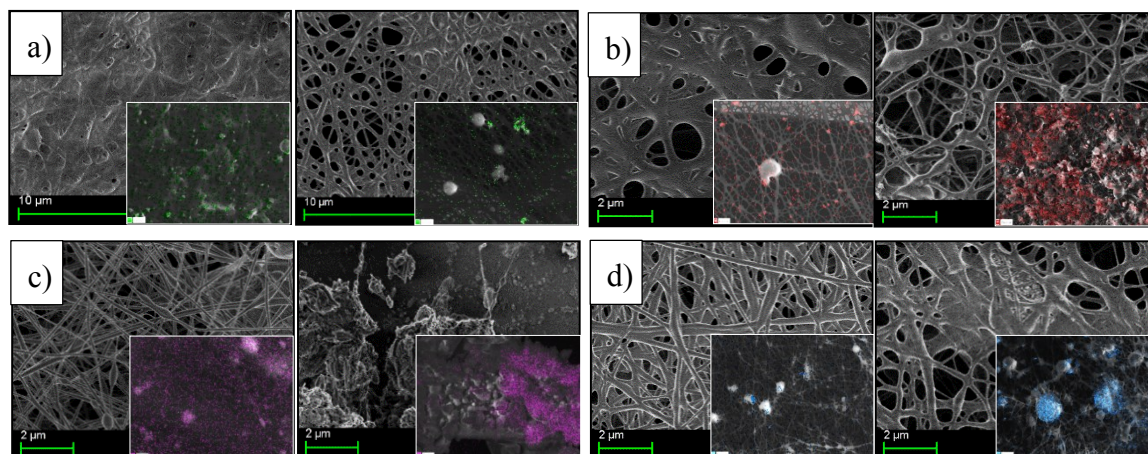
Roztoky směsi CH/PEO bylo nutné připravit odděleně. Nejprve byl připraven roztok 8%-ního chitosanu, v 10%-ní kyselině citrónové. Roztok PEO o koncentraci 4% vznikl smícháním PEO prášku s destilovanou vodou. Oba roztoky bylo nutné nechat přes noc



promíchat na elektromagnetickém míchadle. Dále bylo do roztoku PEO přidáno NaCl o koncentraci 0,85 mol/l. Následně se oba roztoky smíchaly dohromady, kdy vznikl roztok CH/PEO v hmotnostním poměru 8:2. Do jednotlivých polymerních roztoků byla postupně přidávána antibakteriální aditiva  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{TiO}_2$  a  $\text{SnO}_2$  v hmotnostních koncentracích 1 a 10%. Na závěr byla přidána povrchově aktivní látka Triton X-100 o koncentraci 0,1 hm.%.

### Diskuze

Postup přípravy nanovláknenných membrán na bázi CH/PEO je popsán výše. Opět bylo nutné postupně zvláknit roztoky CH/PEO s přidavkem antibakteriálních aditiv. Niže jsou uvedené SEM a EDS snímky (obr. 18 a-d)), které ilustrují morfologii elektrostaticky zvlákněných vláken a opět je vždy u každého snímku podokno, kde je barevně znázorněn obsah antibakteriální složky. Čím je zabarvení výraznější, tím je obsah antibakteriálního aditiva ve vzorku větší.



Obr. 18. Zvyšování koncentrace antibakteriální složky v nanomembráně CH/PEO z 1 na 10hm.%: a)  $\text{SnO}_2$ , b)  $\text{TiO}_2$ , c)  $\text{ZnO}$ , a d)  $\text{ZrO}_2$

V porovnání výše uvedených snímků (obr. 18 a) – d)) se snímky nanovláknenných membrán na bázi PVA (obr. 16 a) – d)), lze konstatovat, že v případě membrány s přidavkem  $\text{SnO}_2$  (1 hm.%) nejsou jednotlivá nanovláknena zcela zřetelná, tvoří síť, ale spíše film, distribuce antibakteriální složky je malá, ale rovnoměrná. Obdobně je tomu u membrány s přidavkem  $\text{TiO}_2$  (1 hm.%), kde jednotlivá vlákna též nemají ostré kontury. Naopak je tomu u nanomembrány s přidavkem  $\text{TiO}_2$  10 hm.%, kde je nanovláknená síť patrná a je zde dobře vidět distribuce antibakteriálního aditiva po celé délce vláken, jak ilustruje i EDS snímek. Nanovláknenná membrána s přidavkem  $\text{ZnO}$  v případě 1 hm.% je nanovláknená síť i



distribuce antibakteriální složky rovnoměrná, v porovnání s 10 hm.% ZnO, kde nejsou jednotlivá vlákna patrná a tvoří spíše shluky hmoty. V případě nanovlákněné membrány s přídavkem  $\text{ZrO}_2$  je patrné, že antibakteriální aditivum uvnitř vláken tvoří shluky. Ve všech případech lze konstatovat, že nanovlákněné membrány ze směsi CH/PEO s přidanými antibakteriálními aditivy dosahovaly morfologie částečně rozpuštěných vláken, což mohlo být způsobeno nedostatečně rychlým odpařením rozpouštědla během procesu zvlákňování. Pro zlepšení tohoto nedostatku by bylo vhodnější v budoucnu připravovat polymerní roztoky CH/PEO s nižší koncentrací tak, aby došlo k úplnému a včasnému odpaření rozpouštědla z roztoku během zvlákňování.

#### 2.5.4 Membrána na bázi CH/PEO – externální způsob inkorporace antibakteriální složky

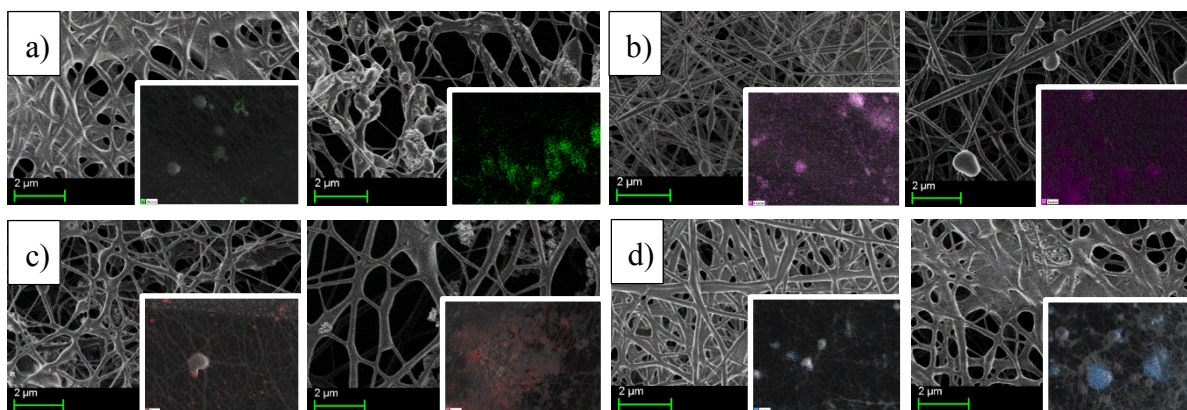
Pro externální způsob inkorporace bylo opět množství antibakteriální složky přepočítáno na množství 1,5 ml polymerního roztoku, tak aby odpovídalo množství aditiva obsaženém v 1 a 10 hm.% tak jako v případě internálního způsobu inkorporace viz tab. 3. Jednotlivá antibakteriální aditiva byla do nanovlákněné membrány inkorporována rozprašením až během procesu zvlákňování roztoku CH/PEO, dle obr. 21.

*Tab.3. Hmotnost antibakteriální složky přidávané do membrány rozprašováním v průběhu elektrostatického zvlákňování*

Antibakteriální aditivum	Hmotnost pro 1 hm.% roztok [g]	Hmotnost pro 10 hm.% roztok [g]
<b>ZrO<sub>2</sub></b>	0,100	1,000
<b>ZnO</b>	0,100	1,000
<b>TiO<sub>2</sub></b>	0,075	0,745
<b>SnO<sub>2</sub></b>	0,122	1,224

#### Diskuze

Srovnání internálního a externálního způsobu inkorporace antibakteriálních aditiv u nanovlákněných membrán o koncentraci 10 hm.% lze vidět na obr. 19. a) - d). Lze pozorovat, že podobně jako tomu bylo u membrán na bázi PVA, i v tomto případě během externálního způsobu inkorporace docházelo k tvorbě shluků aditiv na povrchu vláken. Distribuce nanočástic byla méně rovnoměrná v případě externální inkorporace v porovnání s internální inkorporací



Obr. 19. Porovnání SEM snímků internální (vlevo) a externální (vpravo) způsob inkorporace antibakteriálního aditiva 10 hm. %: a)  $\text{SnO}_2$ , b)  $\text{TiO}_2$ , c)  $\text{ZnO}$ , a d)  $\text{ZrO}_2$

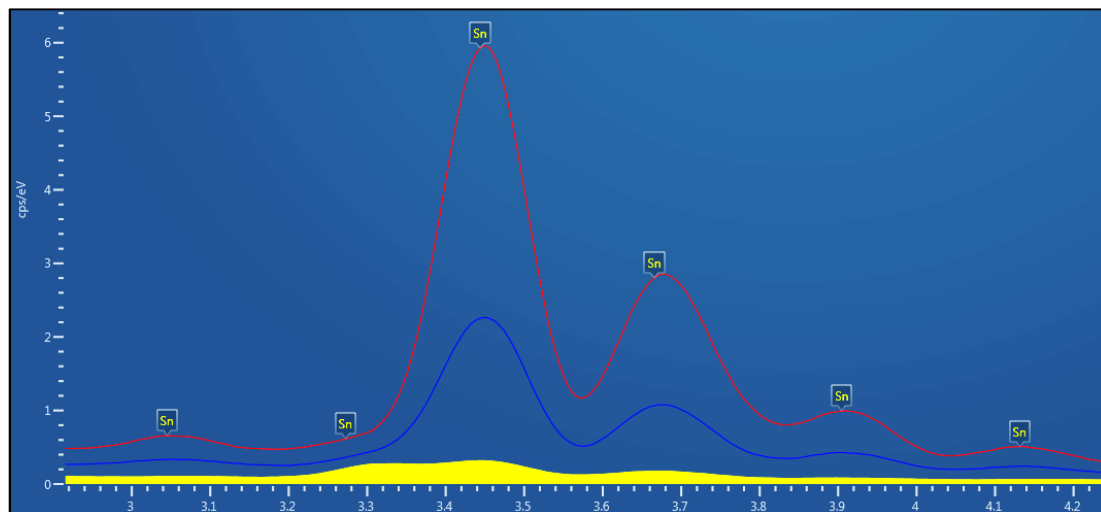
## 2.6 EDS analýza připravených vzorků

Pro kvantitativní popis obsahu inkorporovaného aditiva v nanovlákněných membránách po elektrostatickém zvlákňování bylo potřeba jednotlivé vzorky vyhodnotit pomocí EDS analýzy. Tzv. EDS spektra charakterizují zastoupení a množství jednotlivých chemických prvků v materiálu z určitého zvoleného místa na vzorku. Vodorovná osa udává energii zachycených fotonů RTG záření, přičemž pro charakteristické RTG záření platí, že energie odpovídající přechodům elektronů mezi jednotlivými orbitály (viz obr. 14.) je pro každý prvek specifická. Spektra různých prvků v závislosti na elektronové konfiguraci mohou vykazovat několik maxim odpovídajících různým přechodům ( $K\alpha$ ,  $L\alpha$ ,  $K\beta$ ,...). Poloha maxim na vodorovné ose tedy kvalitativně charakterizuje zkoumaný materiál. Svislá osa [cps/keV] pak znázorňuje intenzitu RTG záření (vyjadřuje množství fotonů charakteristického RTG záření o příslušné energii dopadající na plochu EDS detektoru za jednotku času). Kvantitativní množství prvku je udáno výškou příslušného maxima charakteristického RTG záření

## Diskuze

### 1. Membrána na bázi PVA – internální způsob inkorporace antibakteriální složky

Ze spekter získaných EDS analýzou lze jednoznačně vidět, že s rostoucí koncentrací antibakteriálního aditiva v nanovlákněné membráně roste množství chem. prvku v nanovlákněné membráně.



Graf. 1. EDS -  $\text{SnO}_2$  (internálně)

Analýza EDS nanovlákněné membrány s inkorporovaným  $\text{SnO}_2$  aditivem odpovídá výše uvedeným SEM snímkům, obr. 16. a) - d). S narůstající koncentrací  $\text{SnO}_2$  roste množství detekovaného chem. prvku (Sn) ve spektrografu. 1 hm.% koncentrace  $\text{SnO}_2$  odpovídá 0,2 cps/eV (v grafu znázorněno žlutě) v případě koncentrace  $\text{SnO}_2$  5 hm.% je hodnota cps/eV rovna 2,1 (v grafu znázorněno modrou čarou) a v případě 10%hm. koncentrace  $\text{SnO}_2$  je to pak 5,9 cps/eV (v grafu znázorněno červenou čarou).

Pro lepší porovnání, byl z odečtených hodnot cps/eV vypočítán poměr mezi jednotlivými maximy. S tím, že 10%-ní koncentrace aditiva byla brána jako 100%. V případě  $\text{SnO}_2$  je přepočet poměrů výšek 3, 36 a 100%. V ideálním případě by poměry výšek měly dosahovat hodnoty 10, 50 a 100%, neboť do vrstvy bylo inkorporováno postupně 1, 5 a 10hm.% antibakteriálního aditiva. U  $\text{SnO}_2$  je možné konstatovat, že v případě 1hm.% koncentrace aditiva je skutečné množství detekovaného prvku přibližně o 2/3 nižší a u 5hm.% koncentrace  $\text{SnO}_2$  je skutečné množství aditiva nižší přibližně o 1/3.

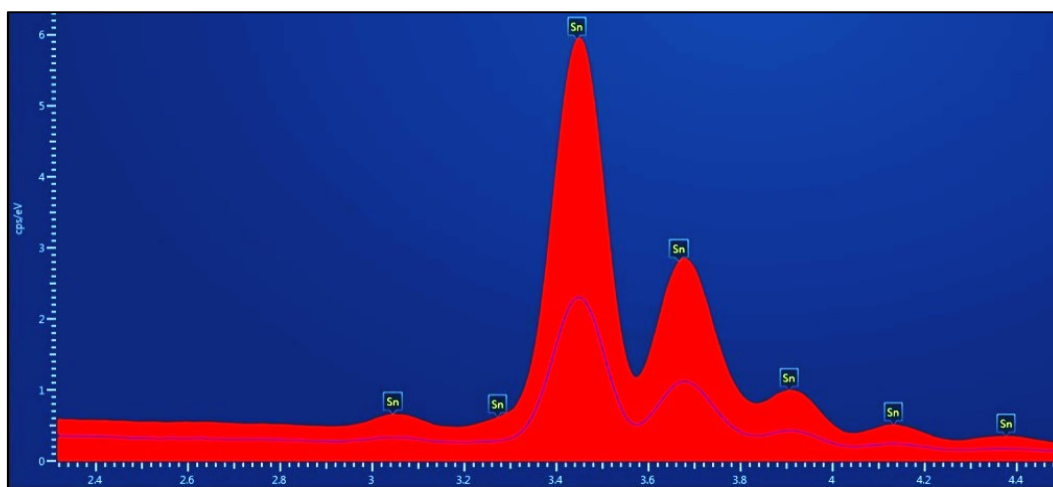
EDS analýza pro nanovlákněnou membránu s přídavkem aditiva ZnO vykazuje podobné výsledky, se zvětšující se koncentrací roste množství aditiva, tento graf je uveden v příloze B. Výška maxim je mezi 5 a 10 hm.% koncentrací téměř dvojnásobná, což

odpovídá předpokladu. Rovněž analýza pro nanovláknennou membránu s  $\text{TiO}_2$  aditivem inkorporovaným internálně, vykazuje očekávané výsledky. (Graf je zobrazen v příloze B). Hodnoty přepočítané na poměr mezi jednotlivými maximy, odpovídají 9, 40 a 100% což se přibližuje téměř „ideálnímu“ poměru.

Z výsledků EDS analýzy lze jednoznačně tvrdit, že s rostoucím přidavkem aditiv do zvlákňovacího roztoku roste skutečné množství aditiva v samotné nanovláknenné membráně. Výsledky ukazují, že téměř všechno aditivum, které bylo do polymerního roztoku přidáno před elektrostatickým zvlákňováním, bylo přeneseno do nanovláknenné membrány během zvlákňování a jen minimální množství aditiva byla nevyužito a zůstalo na zvlákňovací elektrodě. Obavou bylo, že antibakteriální aditivum nebude během zvlákňování kompletně přeneseno polymerním roztokem do nanovláknenné membrány a větší část aditiva bude zůstat na zvlákňovací elektrodě. Tato obava byla výsledky tohoto testu vyvrácena.

## 2. Membrána na bázi PVA – externální způsob inkorporace antibakteriální složky

Ze spektru získaných EDS analýz lze jednoznačně vidět, že metody externální a internální inkorporace bakteriálních aditiv jsou v porovnání velmi rozdílné. V případě internální inkorporace (v grafech zobrazena červeně) je obsah antibakteriálního aditiva vždy vyšší a téměř dvojnásobně. Důvodem je pravděpodobně způsob inkorporace, kde bylo použito stejné navážené množství aditiva pro obě varianty inkorporace, nicméně rozfukováním u externálního způsobu inkorporace (v grafech zobrazena modrou čarou) byla pravděpodobně přibližně polovina aditiva vzduchem odnesena mimo nanovláknennou membránu. Z tohoto pohledu lze tvrdit, že tento způsob inkorporace je velmi neekonomický.



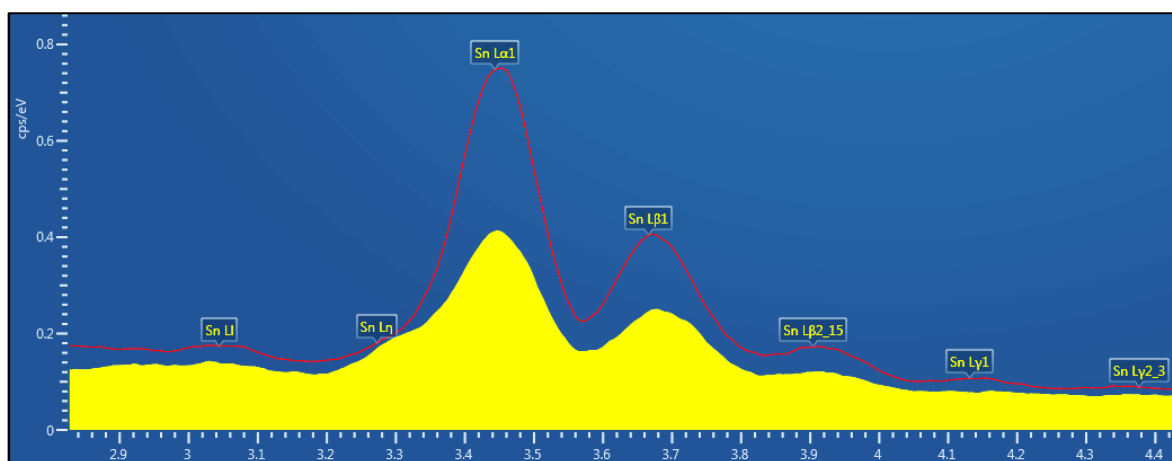
Graf. 2. EDS -  $\text{SnO}_2$  (internálně X externálně)

Ze spektra, kde bylo do membrány inkorporováno  $\text{SnO}_2$  je patrné, že výška maxima u externálního způsobu inkorporace je přibližně 2,3 cps/keV a výška maxima u internálního způsobu inkorporace dosahuje 5,9 cps/keV. Rozdíl hodnot je přibližně 2,5-násobný ve prospěch internálního způsobu inkorporace  $\text{SnO}_2$ . Jak již bylo řečeno výše, tento způsob inkorporace je výrazně efektivnější. Podobných výsledků se dosahovalo v případě inkorporace  $\text{ZnO}$ , viz příloha B. V případě  $\text{TiO}_2$  antibakteriálního aditiva byl naměřen rozdíl hodnot mezi internálním a externálním způsobem inkorporace 3-násobný a pro inkorporaci  $\text{ZrO}_2$  až 5,9-násobný ve prospěch internálního způsobu inkorporace. Příslušné grafy jsou opět vyobrazeny v příloze B.

Opět se potvrzuje fakt, že externální způsob inkorporace není v žádném případě ekonomickým způsobem jak antibakteriální aditivum roz distribuovat do nanovláknenné membrány, a to z důvodu ztráty velkého množství účinné látky, která je finančně nejnáročnější ze všech uvedených chemikálií.

### 3. Membrána na bázi CH/PEO – internální způsob inkorporace antibakteriální složky

Níže uvedený spektrogram ilustruje kvantitativní obsah antibakteriálního aditiva ve vzorku. 1 hm. %-ní koncentrace antibakteriální složky je znázorněna žlutě a 10 hm. % antibakteriální složky červeně jako tomu bylo u spekter pro nanovláknennou membránu PVA.



Graf. 3. EDS - $\text{SnO}_2$  (internálně)

V případě antibakteriálního aditiva  $\text{SnO}_2$  lze vidět, že koncentrace 1 hm. % dosahuje maximum 0,41 cps/keV, u 10 hm. %-ní koncentrace je to 0,67 cps/keV. Při přepočtu na poměr výšek maxim docházíme k výsledku, že 1 hm. %-ní koncentrace odpovídá 61% poměru vůči výšce maxima  $\text{SnO}_2$  10 hm. %, což neodpovídá očekávanému výsledku a je to

zhruba 6x více, než by mělo být. Výrazně blíže předpokládanému obsahu antibakteriální složky jsou výsledky u membrány s přidavkem  $\text{TiO}_2$ , Graf je uveden v příloze B. Nejlepší výsledek v poměru skutečného obsahu antibakteriálního aditiva byl zaznamenán v případě  $\text{ZrO}_2$ , kdy poměr výšek maxim je tedy téměř 10% a 100%. Graf je opět zobrazen v příloze B.

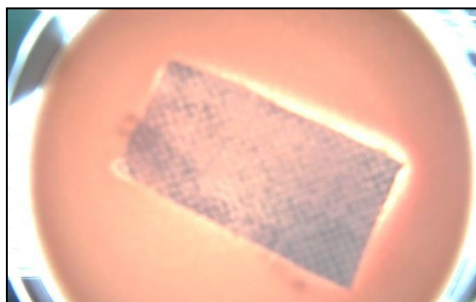
V případě inkorporace antimikrobiálních aditiv do nanovláknenné membrány na bázi CH/PEO lze jednoznačně tvrdit, že s rostoucím přidavkem aditiv do zvlákňovacího roztoku roste skutečné množství aditiva v samotné nanovláknenné membráně. Výsledky poměrové však ukazují, že v některých případech bylo detekováno více aditiva, než které bylo do polymerního roztoku skutečně přidáno před elektrostatickým zvlákňováním. Tento jev může být způsobem tím, že při zvlákňování se do polymerního roztoku přednostně dostávalo aditivum a čistý polymerní roztok zůstával na zvlákňovací elektrodě. Tento efekt by mohl být vysvětlen v případě, že aditivum má mnohem vyšší elektrickou vodivost oproti čistému zvlákňovanému roztoku, a tím je přednostněji zvlákňován.

## **2.7 Antibakteriální testování nanovláknenných membrán**

### **2.7.1 Výsledky antibakteriální aktivity testovaných vzorků zesíťované PVA nanovláknenné membrány**

#### **2.7.1.1 Testovací metoda AATCC 147 – 2004**

Tato metoda hodnotí zónu tlumení bakteriálního růstu kolem vzorku, tzv. halo zónu. Metoda má pouze kvalitativní charakter a blíže byla popsána v kap. 2.5.2. Antibakteriální aktivita testovaných nanovláknenných membrán (síťované PVA) se téměř neprojevila vznikem halo zón. Ve většině vzorků byla zjištěna přítomnost velkého množství (řádově tisíce až desetitisíce) bakteriálních kolonií. Schopnost inhibice se projevila pouze u vzorku s antibakteriálním aditivem  $\text{ZnO}$  (1 a 10 hm.%) a  $\text{TiO}_2$  (10 hm.%) avšak halo zóny nebyly čisté, tudíž lze konstatovat, že tyto vzorky vykazují pouze mírný náznak inhibice viz obr. 20. Skutečnou míru antibakteriální účinnosti potvrdí nebo vyvrátí kvantitativní metoda AATCC 100. Kompletní tabulka s výsledky této metody je vedena v příloze C.



Obr. 20. Halo zóna pro zesíťovanou nanovláknennou membránu PVA s přísávkem 10 hm.% ZnO

### 2.7.1.2 Testovací metoda AATCC 100 – 2004

U metody AATCC 100 je hodnoceno procento redukce bakteriálních kolonií, které udává, o kolik procent došlo ke snížení koncentrace inokula (bakteriální roztok). Blíže je tato metoda popsána v kap. 5.2.1. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce 4.

Tab. 4. Shrnutí výsledků testovaných PVA vzorků (zesíťovaných) metodou AATCC 100

Antibakteriální aktivita testovaných vzorků		
Vzorek	<i>E. coli</i> (10 <sup>5</sup> CFU/ ml)	<i>S. aureus</i> (10 <sup>5</sup> CFU/ ml)
<b>PVA 10%</b>	100 bakteriálních kolonií	100 bakteriálních kolonií
<b>PVA +TiO<sub>2</sub> 1%</b>	200 bakteriální kolonie - 0% inhibice	200 bakteriální kolonie 0% inhibice
<b>PVA +TiO<sub>2</sub> 10%</b>	<b>50 bakteriální kolonie- 50% inhibice</b>	250 bakteriální kolonie - 0% inhibice
<b>PVA + SnO<sub>2</sub> 1%</b>	250 bakteriální kolonie - 0% inhibice	220 bakteriální kolonie - 0% inhibice
<b>PVA + SnO<sub>2</sub> 10%</b>	250 bakteriální kolonie – 0% inhibice	500 bakteriální kolonie - 0% inhibice
<b>PVA +ZnO 1%</b>	<b>90 bakteriální kolonie - 9% inhibice</b>	250bakteriální kolonie - 0% inhibice
<b>PVA +ZnO 10%</b>	<b>75bakteriální kolonie – 25% inhibice</b>	Kompaktní výsev - 0% inhibice
<b>PVA +ZrO<sub>2</sub> 1%</b>	350 bakteriální kolonie - 0% inhibice	600 bakteriální kolonie - 0% inhibice
<b>PVA +ZrO<sub>2</sub> 10%</b>	350 bakteriální kolonie – 0% inhibice	Kompaktní výsev - 0% inhibice

### Diskuze

Testovací metoda AATCC 100 zcela potvrzuje předchozí výsledky metody AATCC147. Inhibiční efekt se projevil pouze v případě síťované nanovláknenné membrány s přísávkem 10hm.% TiO<sub>2</sub> a dále u nanovláknenné membrány s přísávkem ZnO (1 i 10 hm.%) a to pouze u bakteriálního kmene *E.coli*. U ostatních vzorků nebyla inhibiční účinnost zjištěna, jak vůči bakteriálnímu kmenu *E. coli*, tak vůči kmenu *S. aureus*.

Z výsledků obou testovacích antibakteriálních metod je zřejmé, že zásadní vliv na inhibiční účinnost může mít zesíťování nanovláknenných membrán. Lze předpokládat, že síťování neumožnilo rozpuštění nanovláken a důsledkem toho nebylo možné uvolnění antibakteriálního aditiva do prostředí suspenze bakteriálního inokula. Antibakteriální aditiva



tedy zůstala uvnitř vláken v nanomembráně a tím nedošlo ke kontaktu s bakteriemi a z tohoto důvodu se zřejmě antibakteriální účinnost neprojevila. Výjimku tvoří nanovláknenná membrána s 10 hm.%  $\text{TiO}_2$ , kde byla zjištěna inhibiční účinnost 50%, tedy byla usmrcena  $\frac{1}{2}$  bakteriálního kmene *E. coli*. Nanovláknenná membrána s přídavkem  $\text{ZnO}$  (1 hm.% a 10 hm.%) vykazovala též účinnost proti *E. coli* a to konkrétně 9,5% a 25% respektive. Proti bakteriálnímu kmenu *S. aureus* nebyl prokázán žádný inhibiční účinek napříč všech testovaných síťovaných PVA nanovláknenných membrán.

## 2.7.2 Výsledky antibakteriální aktivity testovaných nezesíťovaných PVA nanovláknenných membrán

Z důvodu negativních výsledků síťovaných nanovláknenných membrán PVA, které vychází z předpokladu, že antibakteriální aditivum nebylo z vrstev uvolňováno, bylo žádoucí otestovat tyto vrstvy v nezesíťovaném stavu, tedy ve stavu rozpustném ve vodě.

### 2.7.2.1 Testovací metoda AATCC 147 – 2004

Stejně jako v předešlém případě, metoda AATCC 147 hodnotí inhibiční zónu kolem vzorku, kde dochází k tlumení bakteriálního růstu a níže jsou uvedeny výsledky této metody pro nezesíťovanou nanovláknennou membránu z PVA. Výsledky ilustruje obr. 21.



Obr. 21. Výsledky pro nanomembránu PVA s přídavkem  $\text{ZnO}$ , světlejší oblasti naznačují vznik halo zóny, bílá místa naznačují zbytky rozpuštěné nanomembrány.

Tab. 5. Shrnutí výsledků testovaných PVA nanomembrán (nezesíťovaných) metodou AATCC 147

Antibakteriální aktivita testovaných vzorků		
Vzorek	<i>E. coli</i> ( $10^5$ CFU/ ml)	<i>S. aureus</i> ( $10^5$ CFU/ ml)
PVA 10%	Bez halo zóny	Bez halo zóny
PVA + $\text{TiO}_2$ 1%	Bez halo zóny	Bez halo zóny
PVA + $\text{TiO}_2$ 5%	Bez halo zóny	Bez halo zóny
PVA + $\text{TiO}_2$ 10%	Náznak vzniku halo zóny	Náznak vzniku halo zóny



<b>PVA +SnO<sub>2</sub> 1%</b>	Bez halo zóny	<b>Náznak vzniku halo zóny</b>
<b>PVA +SnO<sub>2</sub> 5%</b>	Bez halo zóny	<b>Náznak vzniku halo zóny</b>
<b>PVA +SnO<sub>2</sub> 10%</b>	Bez halo zóny	<b>Náznak vzniku halo zóny</b>
<b>PVA +ZnO 1%</b>	<b>Náznak vzniku halo zóny</b>	Bez halo zóny
<b>PVA +ZnO 5%</b>	<b>Náznak vzniku halo zóny</b>	<b>Náznak vzniku halo zóny</b>
<b>PVA +ZnO 10%</b>	<b>Náznak vzniku halo zóny</b>	<b>Náznak vzniku halo zóny</b>
<b>PVA +ZrO<sub>2</sub> 1%</b>	Bez halo zóny	Bez halo zóny
<b>PVA +ZrO<sub>2</sub> 5%</b>	Bez halo zóny	<b>Náznak vzniku halo zóny</b>
<b>PVA +ZrO<sub>2</sub> 10%</b>	<b>Náznak vzniku halo zóny</b>	<b>Náznak vzniku halo zóny</b>

### Diskuze

Všechny testované vzorky nezesíťovaných PVA nanovláknenných membrán se při kontaktu s bakteriálním inokulem rozpustily. Důvodem byla skutečnost, že vzorky nebyly zesíťované a tudíž při kontaktu s bakteriálním inokulem došlo k jejich rozpuštění. Červeně jsou v tab. 6 vyznačeny vzorky, u kterých se objevil náznak vzniku halo zón (místa s nižším, případně žádným výskytem bakteriálních kolonií). U žádného ze vzorků testovaných metodou AATCC 147 se neobjevila čistá halo zóna (zóna naprosto bez bakteriálních kolonií). Nicméně, výsledky oproti zesíťovaným nanovláknenným membránám byly pozitivnější. V místech po nanovláknenných vzorcích se objevily první náznaky halo zóny (viz obr. 21). Na základě těchto výsledků nelze v žádném případě konstatovat, jakého antibakteriálního efektu bylo dosaženo kvantitativně.

V rámci této metody testování antibakteriální aktivity lze konstatovat, že nejlepší antibakteriální efekt byl dosažen u nanovláknenné membrány obsahující ZnO aditivum. Náznak halo zóny se zde projevil u všech tří testovaných koncentrací této látky, v případě testování gram-negativního bakteriálního kmene *E. coli*. Pro grampozitivní bakteriální kmeny *S. aureus* nebyl pozorován antibakteriální efekt u membrány s nízkou koncentrací ZnO (1 hm.%), ostatní koncentrace náznak halo zóny vykazovaly. Proti bakteriálnímu kmenu *S. aureus* byl sledován účinek u nanovláknenné membrány s přídavkem SnO<sub>2</sub> (všechny koncentrace) a naopak žádný bakteriální účinek pro bakteriální kmen *E. coli* (všechny koncentrace).

#### 2.7.2.2 Testovací metoda AATCC 100 – 2004

Výsledkem metody AATCC 100 je procento redukce bakteriálních kolonií, jak bylo uvedeno výše. Důvodem otestování antibakteriální účinnosti připravených nanovláknenných

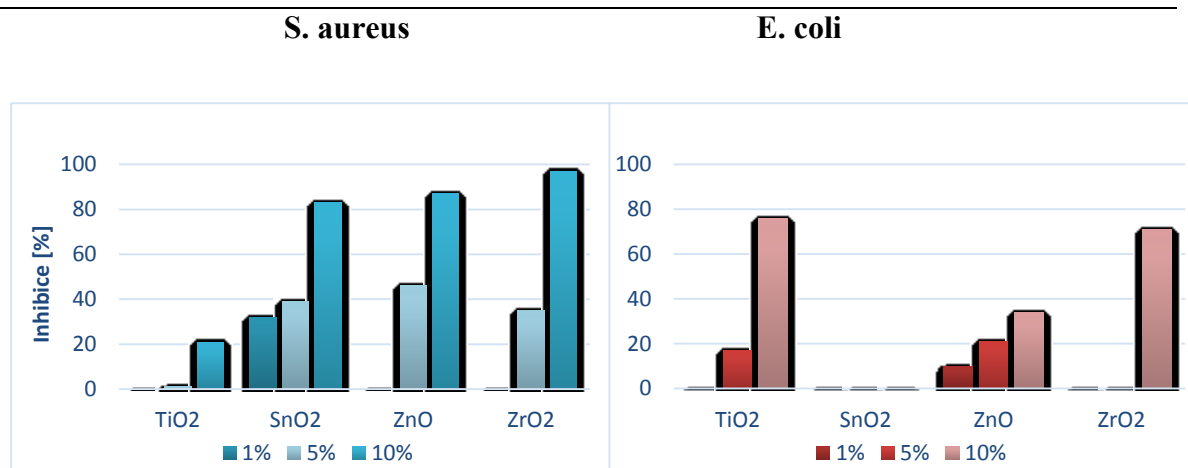
membrán je procentové stanovení inhibice oproti metodě AATCC 147, která je pouze kvalitativní. Výsledky pro nezesíťovanou nanomembránu z PVA jsou popsány v tabulce 6.

Tab. 6. Shrnutí výsledků testovaných PVA vzorků (nesíťovaných) metodou AATCC 100

Antibakteriální aktivita testovaných vzorků		
Vzorek	<i>E. coli</i> (10 <sup>5</sup> CFU/ ml)	<i>S. aureus</i> (10 <sup>5</sup> CFU/ ml)
PVA 10%	103 bakteriálních kolonií	153 bakteriálních kolonií
PVA +TiO <sub>2</sub> 1%	200 bakteriální kolonie - 0% inhibice	201 bakteriální kolonie - 0% inhibice
PVA +TiO <sub>2</sub> 5%	85 bakteriální kolonie - <b>17% inhibice</b>	152 bakteriální kolonie - <b>1% inhibice</b>
PVA +TiO <sub>2</sub> 10%	24 bakteriální kolonie - <b>76% inhibice</b>	121 bakteriální kolonie - <b>21% inhibice</b>
PVA +SnO <sub>2</sub> 1%	201 bakteriální kolonie - 0% inhibice	104 bakteriální kolonie - <b>32% inhibice</b>
PVA +SnO <sub>2</sub> 5%	124 bakteriální kolonie - 0% inhibice	94 bakteriální kolonie - <b>39% inhibice</b>
PVA + SnO <sub>2</sub> 10%	121 bakteriální kolonie - 0% inhibice	26 bakteriální kolonie - <b>83% inhibice</b>
PVA +ZnO 1%	93 bakteriálních kolonií - <b>10 % inhibice</b>	203 bakteriální kolonie - 0% inhibice
PVA +ZnO 5%	81 bakteriální kolonie - <b>21% inhibice</b>	82 bakteriální kolonie - <b>46% inhibice</b>
PVA +ZnO 10%	34 bakteriální kolonie - <b>58% inhibice</b>	20 bakteriální kolonie - <b>87% inhibice</b>
PVA +ZrO <sub>2</sub> 1%	150 bakteriální kolonie - 0% inhibice	173 bakteriální kolonie - 0% inhibice
PVA +ZrO <sub>2</sub> 5%	152 bakteriální kolonie - 0% inhibice	100 bakteriální kolonie - <b>35% inhibice</b>
PVA +ZrO <sub>2</sub> 10%	30 bakteriální kolonie - <b>71% inhibice</b>	4 bakteriální kolonie - <b>97% inhibice</b>

## Diskuze

Testované nezesíťované vzorky nanovlákných PVA membrán vykazují antibakteriální aktivitu vůči oběma bakteriálním kmenům. I v tomto případě testování došlo k rozpuštění nanovlákných membrán po přidání bakteriální suspenze. Viditelné bakteriální kolonie se na miskách vyskytovaly převážně v jednotkách kolonií, drobné bakteriální kolonie však ve stovkách až tisících. Pro lepší názornost byly výsledky zpracovány do grafu 14, kde je na svislé ose uvedeno % inhibice (udává, o kolik % se snížila inokulovaná koncentrace bakterií) a na vodorovné ose antibakteriální aditivum.



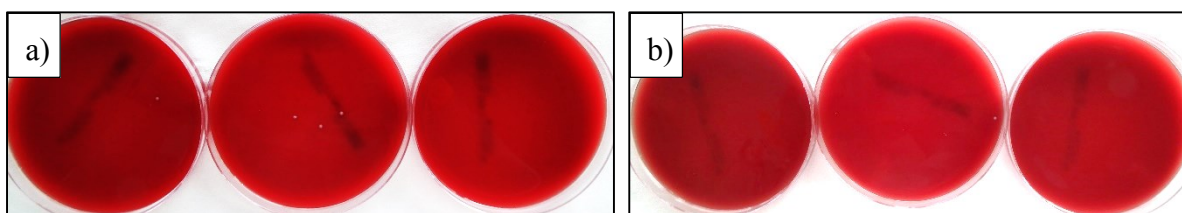
Graf 4. Procento inhibice pro nanomembrány z PVA (nesíťované) vůči kmenu: a) *S. aureus* a b) *E. coli*

Z grafu 4. a) lze jednoznačně říci, že efekt antibakteriálního účinku na bakteriální kmen *S. aureus* mají všechna aditiva. V případě 10 hm.% koncentrace aditiva výsledky vykazují inhibiční efekt 21, 83, 87 a 97 % pro TiO<sub>2</sub>, SnO<sub>2</sub>, ZnO a ZrO<sub>2</sub> respektive. V porovnání s inhibičním efektem vůči bakteriálnímu kmenu *E. coli* jsou tyto výsledky jednoznačně vyšší a to přibližně dvojnásobně. Co se týče bakteriálního kmene *E. coli* výsledky vykazují inhibiční efekt pro 10 hm.% aditiva 76, 34 a 71 % pro TiO<sub>2</sub>, ZnO a ZrO<sub>2</sub> respektive. Pro SnO<sub>2</sub> se potvrdily výsledky z předchozí testovací metody a to v případě bakteriálního kmene *E. coli* nevykazuje tato nanovlákněná membrána žádný antibakteriální efekt (viz. graf 4. b), ve srovnání s bakteriálním kmenem *S. aureus*, kde lze pozorovat jedny z nejvyšších hodnot procenta inhibice a to 32, 39 a 83% pro 1, 5 a 10 hm%, respektive. Obdobně je tomu i u nanovlákněné membrány s 1 a 5 hm.% ZrO<sub>2</sub>, která též vykazuje inhibiční efekt vůči bakteriálnímu kmenu *E. coli* až při 10 hm% koncentraci aditiva. Vůči kmenu *S. aureus* toto aditivum vykazuje lepší výsledky, zejména u 10 hm.%, kde je procento inhibice vůbec nejvyšší a to 97%.

Pokud se jedná o účinek zvyšování aditiva v nanovlákněné vrstvě, tak v tomto případě s rostoucím procentem aditiva roste inhibiční efekt. Nejlépe lze hodnotit antibakteriální aditivum ZnO, kde v případě kmene *E. coli* dosahuje inhibiční efekt 10, 21 a 34 % pro koncentrace 1, 5 a 10 hm.% a 46, 87 % inhibiční efekt pro koncentrace 5 a 10hm.% kmen *S. aureus* (viz obr. 22) Naproti tomu, inhibiční účinnost TiO<sub>2</sub> je významná až při 10 hm.% koncentraci, kdy dosahuje hodnot 21% pro kmen *S. aureus* a 76 % pro kmen *E. coli*. Koncentrace 5 hm.% TiO<sub>2</sub> nemá žádný inhibiční účinek vůči kmenu *S. aureus* a 17 % inhibiční účinek vůči kmenu *E. coli*. V případě antibakteriálního aditiva ZrO<sub>2</sub> je situace

opačná, inhibiční efekt se projevil 35% a 97% při koncentraci 5 a 10 hm% aditiva v případě kmene *S. aureus* v porovnání s pouze jediným případem inhibiční účinnosti vůči kmenu *E. coli* a to konkrétně 71% v případě 10 hm.% koncentrace aditiva.

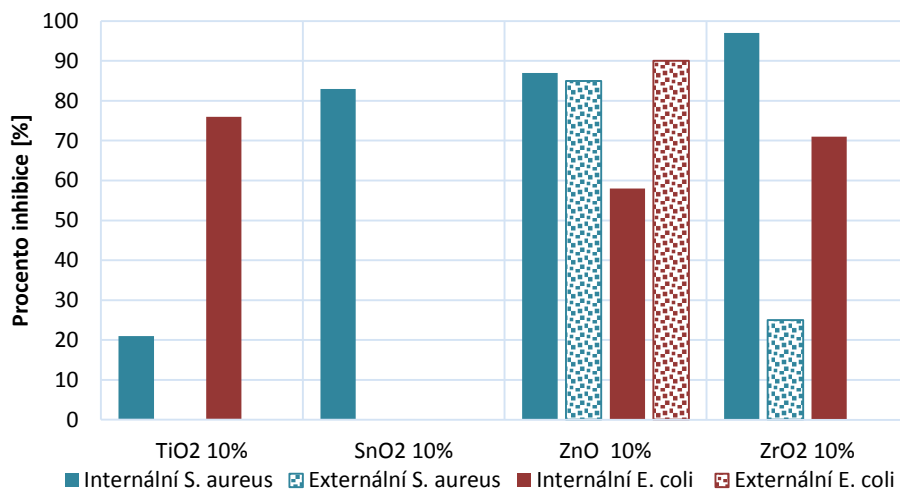
Z výše uvedeného vyplývá, že antibakteriální efekt napříč jednotlivých antibakteriálních aditiv a jejich koncentrací je výrazně lepší vůči kmeni *S. aureus*. Vůči tomuto bakteriálnímu kmenu byla nejúčinnější nanovlákněná membrána s přídavkem  $\text{SnO}_2$ , dále pak  $\text{ZrO}_2$  a  $\text{ZnO}$  o koncentraci 10 hm.%. Vůči kmenu *E. coli* byla nejúčinnější nanovlákněná membrána s  $\text{TiO}_2$  a  $\text{ZnO}$  v při koncentraci 10 hm.%. Pro antibakteriální efekt vůči oběma druhům bakteriálních kmenů lze použít nanovlákněnou membránu s přídavkem  $\text{ZnO}$ , který vykazoval účinnost jak vůči kmenu *E. coli*, tak vůči kmenu *S. aureus* již při koncentraci 5 hm.%.



Obr. 22. Výsledky antibakteriálního testování metodou AATCC 100 – 2004 pro membránu s přídavkem  $\text{ZnO}$  pro a) *E. coli* a b) *E. aureus*

### 2.7.3 Výsledky antibakteriální aktivity testovaných nezesít'ovaných PVA nanovlákněných membrán - externální způsob inkorporace antibakteriálního aditiva

Při výrobě nanovlákněných membrán bylo antibakteriální aditivum inkorporováno nejen přímo v rámci elektrostatického zvlákňování, kdy polymerní roztok v sobě aditivum o určité koncentraci obsahoval, ale také bylo dodáváno zvlášť rozfukováním v průběhu procesu elektrostatického zvlákňování. Takto připravené vzorky (s obsahem antibakteriální složky 10 hm.%) byly rovněž testovány pro svou antibakteriální účinnost. V tomto případě byla testována pouze metoda kvantitativní (metoda AATCC 100) z důvodu možnosti porovnání inhibičního efektu nanovlákněné membrány s inkorporovanými aditivem externálně vs. internálně (10 hm.%). Tabulka shrnující výsledky metody AATCC 100 je uvedena v příloze C. Pro porovnání dat antibakteriálního testování nanovlákněných membrán s internální a externální inkorporací aditiva byl vytvořen následující graf 5.

**Internální vs. Externální inkorporace aditiva**

Graf 5. Procento inhibice pro nanovláčenou membránu z PVA internálně vs. externálně inkorporovaná aditiva

**Diskuze**

Antibakteriální aktivita externálně inkorporovaných aditiv v PVA nanovláčenné membráně vykazuje negativní výsledky pro oba bakteriální kmeny *E. coli* i *S. aureus* v případě TiO<sub>2</sub> a SnO<sub>2</sub>. V případě aditiva ZrO<sub>2</sub> byla zaznamenána inhibiční účinnost pouze vůči kmenu *S. aureus* a to konkrétně 25 %, vůči bakteriálnímu kmenu *E. coli* inhibiční účinnost prokázána nebyla. Oproti tomu antibakteriální aditivum ZnO vykazuje vysoké procento inhibiční účinnosti a to konkrétně 90 % vůči kmenu *E. coli* a 85 % vůči kmenu *S. aureus*.

Uvedené hodnoty inhibiční účinnosti externálně inkorporovaných aditiv do nanovláčenných membrán kopírují výsledky získané z EDS analýzy. V případě externální inkorporace antibakteriálních aditiv je distribuce aditiva značně nerovnoměrná a v mnoha případech aglomeruje do shluků. V důsledku toho lze výše uvedené výsledky metody AATCC 100 přičíst faktu, že velmi záleží na konkrétním místě, ze kterého byl vzorek pro testování odebrán. Je velice pravděpodobné, že v případě nanovláčenné membrány se ZnO byl testován vzorek s vysokou koncentrací shluků na povrchu vláken a to je možnou příčinou vysoké inhibiční účinnosti. Naopak v ostatních případech externálně inkorporovaných aditiv, byla pravděpodobně vybrána místa, kde se antibakteriální složka na nanovláčkách neuchytila a tudíž je zde absence antibakteriální účinnosti.

## 2.7.4 Výsledky antibakteriální aktivity testovaných vzorků CH/PEO nanovláčenné membrány

Poslední série testování antibakteriální účinnosti byla realizovaná na nanovláčenných membránách na bázi CH/PEO. Antibakteriální aditivum bylo v membráně o koncentraci 1 a 10 hm.% pro internální způsob inkorporace a 10 hm.% pro externální způsob inkorporace.

### 2.7.4.1 Testovací metoda AATCC 100 – 2004

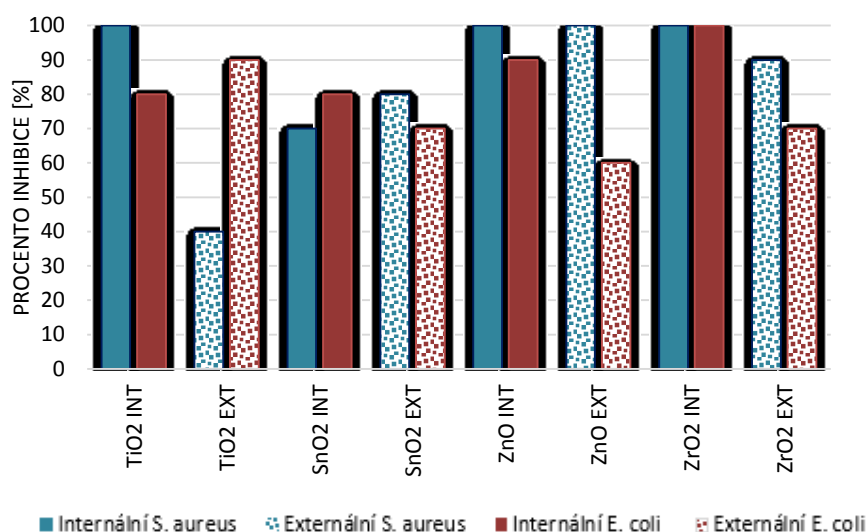
Z důvodu porovnání kvality nanovláčenných membrán z pohledu antibakteriálních vlastností byla pro testování membrán CH/PEO zvolena metoda AATCC 100 popsána v kapitole 2.5.1 Výsledky této metody jsou uvedeny v tab. 7

Tab. 7. Shrnutí výsledků testovaných CH/PEO vzorků metodou AATCC 100

Antibakteriální aktivita testovaných vzorků		
Vzorek	<i>E. coli</i> (10 <sup>5</sup> CFU/ ml)	<i>S. aureus</i> (10 <sup>5</sup> CFU/ ml)
CH/PEO	10 bakteriální kolonie	10 bakteriální kolonie
CH/PEO +TiO <sub>2</sub> 1%	3 bakteriální kolonie - <b>70% inhibice</b>	5 bakteriálních kolonií - <b>50% inhibice</b>
CH/PEO +TiO <sub>2</sub> 10% int	0 bakteriální kolonie - <b>100% inhibice</b>	2 bakteriální kolonie - <b>80% inhibice</b>
CH/PEO +TiO <sub>2</sub> 10% ext	6 bakteriálních kolonií - <b>40% inhibice</b>	1 bakteriální kolonie - <b>90% inhibice</b>
CH/PEO +SnO <sub>2</sub> 1%	4 bakteriální kolonie - <b>60% inhibice</b>	4 bakteriální kolonie - <b>60% inhibice</b>
CH/PEO +SnO <sub>2</sub> 10% int	3 bakteriální kolonie - <b>70% inhibice</b>	2 bakteriální kolonie - <b>80% inhibice</b>
CH/PEO +SnO <sub>2</sub> 10% ext	2 bakteriální kolonie - <b>80% inhibice</b>	3 bakteriální kolonie - <b>70% inhibice</b>
CH/PEO +ZnO 1%	0 bakteriální kolonie - <b>100% inhibice</b>	2 bakteriální kolonie - <b>80% inhibice</b>
CH/PEO +ZnO 10% int	0 bakteriální kolonie - <b>100% inhibice</b>	1 bakteriální kolonie - <b>90% inhibice</b>
CH/PEO +ZnO 10% ext	0 bakteriální kolonie - <b>100% inhibice</b>	4 bakteriální kolonie - <b>60% inhibice</b>
CH/PEO +ZrO <sub>2</sub> 1%	3 bakteriální kolonie - <b>70% inhibice</b>	3 bakteriální kolonie - <b>70% inhibice</b>
CH/PEO +ZrO <sub>2</sub> 10% int	0 bakteriální kolonie - <b>100% inhibice</b>	0 bakteriální kolonie - <b>100% inhibice</b>
CH/PEO +ZrO <sub>2</sub> 10% ext	1 bakteriální kolonie - <b>90% inhibice</b>	3 bakteriální kolonie - <b>70% inhibice</b>

### Diskuze

Na rozdíl od předchozích testování nanovláčenných membrán z PVA, vykazují všechny testované nanovláčenné membrány CH/PEO vysoký inhibiční efekt. Výsledky jsou zaneseny do graf 6.

**Internální vs. Externální inkorporace aditiva CH/PEO membrána**

*Graf 6. Procento inhibice pro nanomembrány z CH/PEO*

Kvantitativní metoda AATCC 100 ukazuje na velmi dobrou antibakteriální aktivitu samotných testovaných nanovláčených membrán i bez přídavku antibakteriálních aditiv. Na miskách se objevily bakteriální kmeny v jednotkách kolonií, v porovnání se stovkami kolonií v případě nanomembrán na bázi PVA.

Na základě výsledků metody AATCC 100 uvedených v grafu 6. lze jednoznačně konstatovat, že nanovláčené membrány na bázi CH/PEO vykazují nejlepší antibakteriální aktivitu. Zejména s přídavkem ZnO, vykazuje vůči bakteriálnímu kmenu *E. coli* ve všech případech 100% inhibiční účinnost. Pro *S. aureus* vykazuje 100% inhibiční účinnost nanovláčená membrána s přídavkem 10 hm.% ZrO<sub>2</sub> a 90% inhibiční účinnost s přídavkem TiO<sub>2</sub> (10 hm.%). Na základě výše uvedených výsledků lze pro své antibakteriální vlastnosti použít samotnou nanovláčenou membránu na bázi CH/PEO bez nutnosti přidávat antibakteriální aditiva. Nicméně po přidání aditiva ZnO je možné očekávat 100% antibakteriální účinnost již při koncentraci 1 hm.% vůči bakteriálnímu kmeni *E. coli* a 90% antibakteriální účinnost vůči bakteriálnímu kmeni *S. aureus*. Uvedené výsledky korespondují s vědeckou studií Kong M. a kol. (2010) [63] uvedenou v příloze E.

Dle Ikeda a Tazuke, (1984) není zatím přesný mechanismus působení chitosanu na buněčné stěny mikroorganismů znám. Předpokládá se, že antibakteriální aktivita působí v několika krocích: (1) adsorpce na povrch buňky, (2) difuze přes buněčnou stěnu, (3) adsorpce do cytoplasmatické membrány buňky, (4) narušení cytoplasmatické membrány, (5) narušení vnitřního uspořádání buňky a (6) smrt buňky. [64]

## 2.8 Shrnutí dosažených výsledků

Cílem diplomové práce byl vývoj nanovlákněné membrány s antibakteriálním účinkem. Nanovlákněné membrány byly vytvořeny metodou elektrostatického zvlákňování a dle zadání byla antibakteriální složka inkorporována do nanovlákněné membrány dvěma způsoby. První způsob byl internální, tzn. antibakteriální aditivum o určité koncentraci bylo přidáno přímo do zvlákňovacího polymerního roztoku. Druhý způsob byl externální, kdy tato metoda byla realizována pomocí rozfukovací nádoby, kam bylo potřebné množství antibakteriální složky naváženo a do membrány se rozfukováním vpravilo přímo při procesu elektrostatického zvlákňování. Antibakteriálními aditivy byly zvoleny následující nanočástice s prokázanými antibakteriálními účinky:  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SnO}_2$ ,  $\text{ZnO}$  a  $\text{ZrO}_2$ . Nejprve byl pro zvlákňování vybrán polymer PVA. Bylo zjištěno, že na průběh elektrostatického zvlákňování a morfologii výsledných vláken a distribuci přidávaných aditiv má pozitivní vliv přítomnost povrchově aktivní látky (Triton X-100).

Následně byly vyrobeny nanovlákněné membrány obsahující antibakteriální aditivum v koncentracích 1, 5 a 10 hm.% inkorporovaných jak metodou externální, tak metodou internální. Analýza SEM poskytla informace ohledně uspořádání a morfologii vláken ve vlákněné vrstvě a případný vliv povrchově aktivní látky. Analýza EDS u nanovlákněných membrán potvrdila vzrůstající množství antibakteriální složky v souvislosti se zvyšováním její koncentrace (u internálního způsobu inkorporace). Bylo zjištěno, že internální způsob inkorporace zajišťuje rovnoměrnější přítomnost antibakteriálních složek, naopak externální způsob byl shledán jako neekonomický a neefektivní. Antibakteriální aditiva měla buď tendenci aglomerovat do shluků, nebo naopak vlivem rozfukování v jiných částech membrány chyběla úplně.

Následně byly vzorky předány na antibakteriální testování. Testování bylo prováděno metodou AATCC 147 – 2004 a AATCC 100 – 2004. Obě metody testovaly antibakteriální aktivitu na gram-negativní bakteriální kmen *E. coli* a grampozitivní



bakteriální kmen *S. aureus*. Metoda AATCC 147 hodnotila vznik halo zóny kolem vzorku umístěného na agarové misce s bakteriální suspenzí. Metoda AATCC 100 hodnotila procento inhibice bakteriálních kolonií v inokulu. Výsledky antibakteriální účinnosti nanovláknenných membrán PVA zesíťovaných byly oproti očekávání negativní. Obě testovací metody potvrdily bakteriální aktivitu jen u tří vzorků a to konkrétně u nanovláknenné membrány s  $\text{TiO}_2$  10 hm.%, se  $\text{ZnO}$  10 hm.% a 1 hm.%. Bylo diskutováno, že tyto neuspokojivé výsledky mohou být důsledkem procesu zesíťování PVA nanovláknenných membrán, kdy účinná látka nemohla být vlivem zesíťování uvolněna z vláken a nemohla tak antibakteriálně působit.

Z toho důvodu následovala výroba druhé sady nanovláknenných membrán, s tím rozdílem, že PVA membrány nebyly na závěr zesíťovány. Výsledky antibakteriálního testování obou metod dopadly mnohem lépe a potvrdila se tedy domněnka o negativním vlivu zesíťování na antibakteriální účinnost. Nejlepší výsledky inhibiční účinnosti dosahovala membrána s 10 hm.%  $\text{ZrO}_2$ , následuje membrána s 10 hm.%  $\text{ZnO}$  a 10 hm.%  $\text{SnO}_2$  proti kmenu *S. aureus*. Proti kmen *E. coli* byla nejúčinnější membrána s obsahem 10 hm.%  $\text{TiO}_2$  a následuje membrána s 10 hm.%  $\text{ZrO}_2$ ,

Dalším krokem bylo prověřit vliv způsobu inkorporace na antibakteriální účinnost vyrobených nanovláknenných membrán. Nezesíťované PVA membrány s 10 hm.%-ní koncentrací účinného aditiva byly rovněž testovány oběma metodami AATCC 147 i AATCC 100. Zde byly výsledky velmi proměnlivé. V případě nanovláknenné membrány s aditivem  $\text{ZnO}$ , externálně inkorporovaným byla prokázána inhibiční účinnost 90% oproti kmenu *E. coli* a 85% účinnost oproti kmenu *S. aureus*. Naopak nanovláknenné membrány s externálně inkorporovanými aditivy  $\text{TiO}_2$  a  $\text{SnO}_2$  nevykazovaly žádnou antibakteriální aktivitu vůči oběma kmenům. Tyto výsledky korespondují se skutečností z již zmíněné EDS analýzy, kde bylo vyšetřováno množství externálně inkorporovaných aditiv, a kde bylo rozmístění a množství účinné látky v nanovláknenné membráně značně nerovnoměrné.

Na základě výše zmíněných výsledků antibakteriální účinnosti byla připravena poslední sada vzorků nanovláknenných membrán, kde zvláknovací polymer PVA byl nahrazen chitosanem. Aby mohl být chitosan elektrostaticky zvlákněn, bylo zapotřebí smíchat ho s PEO, do výsledných zvláknovacích roztoků byla opět přidána povrchově aktivní látka Triton X-100. Příprava nanovláknenných membrán CH/PEO probíhala opět stejným způsobem, kdy byly připraveny nanovláknenné membrány s koncentrací 1 a 10 hm.%

---

antibakteriálních aditiv internálním způsobem a zvlášť nanovlákněné membrány s 10 hm. %-ní koncentrací antibakteriální složky externálním způsobem.

Membrány na bázi CH/PEO byly opět analyzovány metodou SEM, tak aby byl vyšetřen vzhled vlákněné struktury a morfologie jednotlivých vláken a metodou EDS. Opět se potvrdil jednak fakt, že se vzrůstající koncentrací přidané antibakteriální složky, roste i její množství v nanovlákněné membráně, a jednak i skutečnost, že externální způsob inkorporace není efektivní ani opakovatelnou metodou.

Testovací metoda AATCC 100 prokázala, že už jen samotná nanovlákněné membrána CH/PEO bez antibakteriálního aditiva vykazovala velkou míru antibakteriální účinnosti, kde po 48 hodinách inkubace bylo inhibováno množství bakteriálních kolonií, konkrétně 10 (pro oba bakteriální kmeny) v porovnání s hodnotou 102 (vůči *E. coli*) a 104 (vůči *S. aureus*) pro nezesíťovanou PVA membránu a 103 (vůči *E. coli*) a 153 (vůči *S. aureus*) pro zesíťovanou PVA membránu. 100 %-ní antibakteriální účinnost oproti *S. aureus* vykazovala membrána: TiO<sub>2</sub> 10 hm.% (internálně inkorporovaná), ZnO 10 hm.% (internálně inkorporovaná), a ZrO<sub>2</sub> 10 hm.% (internálně inkorporovaná). Vůči *E. coli* byla 100% inhibiční účinnost prokázána u nanovlákněné membrány ZrO<sub>2</sub> 10 hm.% (internálně inkorporovaná).

Z předložených výsledků je možné vyvodit následující: vhodnější polymer pro přípravu antibakteriálních nanovlákněných membrán je z důvodu vlastní antibakteriální účinnosti směs CH/PEO. Do zvlákněvacích roztoků je z důvodu snadnějšího průběhu elektrostatického zvlákněování výhodnější přidat povrchově aktivní látku, která snižuje povrchové napětí roztoku a má pozitivní vliv na rovnoměrnější distribuci antibakteriálních aditiv v nanovlákněných membránách. Bylo zjištěno, že není vhodné nanovlákněné membrány síťovat, jelikož tímto procesem se znemožní proniknutí antibakteriálního aditiva přímo k bakteriím, v důsledku toho je antibakteriální efekt minimální. Nejvýraznější antibakteriální účinnost vykazuje antibakteriální aditivum ZnO, následuje ZrO<sub>2</sub>, zejména vůči kmenu *E. coli*. Vůči kmenu *S. aureus* jsou účinná aditiva ZrO<sub>2</sub> a SnO<sub>2</sub>.

---

## ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo vyrobit nanovláknennou membránu s antibakteriálními aditivy v různých koncentracích a její antibakteriální účinnost otestovat. Nejprve byla v teoretické části prostudována výroba nanovláknenných membrán metodou elektrostatického zvlákňování. V následující části je obecně popsána problematika bakterií a možnosti, jak lze úspěšně potlačit jejich růst a tím i jejich případnou patogenitu pro člověka. Též byly prostudovány způsoby testování antibakteriální účinnosti a to jak obecně, tak i konkrétně v textilní praxi. Na závěr byla vypracována rešeršní část, která se zabývá současnými trendy ve vývoji antibakteriálních aplikací v nano-měřítku. Na základě prostudovaných studií byla jako antibakteriální aditiva zvolena  $\text{SnO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$  a  $\text{ZrO}_2$ .

V experimentální části byly postupně metodou elektrostatického zvlákňování vyrobeny nanovláknenné membrány z polymeru PVA a to zesíťované a nezesíťované a se všemi čtyřmi typy antibakteriálních aditiv o koncentracích 1, 5 a 10 hm.%. A dále nanovláknenné membrány na bázi CH/PEO o koncentraci antibakteriálních aditiv 1 a 10 hm.%. Inkorporace antibakteriálních aditiv probíhala formou internálního způsobu inkorporace a externálního způsobu inkorporace. Vyrobené nanovláknenné membrány byly analyzovány metodou SEM a EDX, kdy ze SEM snímků byla vyšetřována morfologie nanovláken. EDX analýza potvrdila, že vzrůstající množství antibakteriální látky v nanovláknenných membránách kopíruje její vzrůstající koncentraci v grafech EDX. A následně prokázala, že testovaný externální způsob inkorporace není ekonomicky efektivní. Následovalo antibakteriální testování nanovláknenných membrán proti gramnegativnímu bakteriálnímu kmenu *E. coli* a grampozitivnímu kmenu *S. aureus*. Bylo zjištěno, že antibakteriální aditivum se ze zesíťované nanovláknenné membrány nemůže uvolnit, což je příčinou špatné antibakteriální účinnosti. U nanovláknenné membrány, která nebyla zesíťovaná, byla prokázána výraznější antibakteriální účinnost. Nicméně nejlepší výsledky testů antibakteriálních vlastností byly zjištěny u nanovláknenných membrán na bázi CH/PEO. S přihlédnutím ke skutečnosti, že chitosan má sám o sobě antibakteriální vlastnosti, tak s přidáním 10 hm.% antibakteriálního aditiva s  $\text{ZnO}$  bylo dosaženo 100% bakteriální účinnosti pro oba bakteriální kmeny.

---

V diplomové práci bylo dle zadání vyrobeno několik typů nanovlákených membrán, z nichž po EDS analýze a testování antibakteriálních účinků byla jako nejlepší vyhodnocena nanovláknenná membrána na bázi CH/PEO s internálním způsobem inkorporovanou účinnou složkou ZnO, následuje složka ZrO<sub>2</sub> a TiO<sub>2</sub>.

Pro další experimenty v této oblasti by bylo vhodné optimalizovat koncentraci zvlákňovaného roztoku CH/PEO, neboť ve všech případech nanovláknenných membrán CH/PEO lze konstatovat, že nanovláknenné membrány s přidanými antibakteriálními aditivy dosahovaly morfologie částečně rozpuštěných vláken, což mohlo být způsobeno nedostatečně rychlým odpařením rozpouštědla během procesu zvlákňování. Pro zlepšení tohoto nedostatku by bylo vhodnější v budoucnu připravovat polymerní roztoky CH/PEO s nižší koncentrací tak, aby došlo k úplnému a včasnému odpaření rozpouštědla z roztoku během zvlákňování.

Toto však překračuje rámec této diplomové práce a slouží spíše jako návrh pro další experiment.

Výroba antibakteriálních nanovláknenných membrán by v budoucnu mohla nahradit stávající produkty a tím například urychlit hojení ran a zabránit možnosti zaneść do rány infekci. Možné použití těchto membrán by mohlo směřovat do medicínských aplikací zejména pro obvazové materiály, materiály pro krytí ran apod. Další možností jsou kosmetické produkty, například pro problematickou pleť.

---

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ODSTRČIL, Jaroslav a Antonín HRŮZA. *Biologie pro zdravotnické školy*. Vyd. 5., přeprac. a rozš. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2008, 216 s. ISBN 978-80-7013-471-9.
- [2] RYŠKOVÁ, Olga. *Základy lékařské mikrobiologie a imunologie: učební texty pro bakalářské studium*. 1. dotisk 1. vyd. Praha: Karolinum, 2007, 130 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 978-802-4601-359.
- [3] KAPRÁLEK, František. *Základy bakteriologie*. Praha: Karolinum, 2000, 241 s. ISBN 80-718-4811-5.
- [4] Tvary bakteriálních buňek. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2014-02-10]. Dostupné z: <[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/02/Bacterial\\_morphology\\_diagram\\_cs\\_%282%29.svg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/02/Bacterial_morphology_diagram_cs_%282%29.svg)>.
- [5] Stavba bakteriální buňky. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2014-02-10]. Dostupné z: <[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/ef/Average\\_prokaryote\\_cell\\_cs.svg/500px-Average\\_prokaryote\\_cell\\_cs.svg.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/ef/Average_prokaryote_cell_cs.svg/500px-Average_prokaryote_cell_cs.svg.png)>.
- [10] Rozdíl ve stavbě buněčné stěny. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2014-02-10]. Dostupné z: <[http://wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Rozdíly\\_ve\\_složení\\_povrchových\\_struktur\\_u\\_bakterií.jpg](http://wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Rozdíly_ve_složení_povrchových_struktur_u_bakterií.jpg)>.
- [11] MACHÁČEK, Tomáš. PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UK V PRAZE. *Biomach: Bakterie* [online]. Červen 2012. červen 2012 [cit. 2012-12-20]. Dostupné z: <http://biomach.cz/mikrobiologie/bakterie>.
- [12] KRMENČÍK, Pavel a Jiří KYSILKA. Toxicon: Escherichia coli. *Biotox.cz* [online]. 2007 [cit. 2014-03-15]. Dostupné z: <[http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/escherichia\\_coli.php](http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/escherichia_coli.php)>.
- [13] Escherichia coli. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2014-02-11]. Dostupné z: <[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e8/Escherichia\\_coli\\_Gram.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e8/Escherichia_coli_Gram.jpg)>.
- [14] Staphylococcus aureus. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2014-02-11]. Dostupné z: <[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Staphylococcus\\_aureus\\_VISA\\_1.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Staphylococcus_aureus_VISA_1.jpg)>.
- [15] BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha: Marvil, 1996, 558 s. ISBN 859-4-315-0528-0.
- [16] ZAHRADNICKÝ, Jiří. *Mikrobiologie a epidemiologie: učební text pro stř. zdravot. školy, stud. obor zdravotní laborant*. 1. vyd. Praha: Avicenum, 1987, 623 s. ISBN 08-007-87.

- [17] Difuzní diskový test. In: *Příručka mikrobiologie pro bakaláře 3. LF UK* [online]. 2014- [cit. 2014-05-10]. Dostupné z: <[http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/uceb/obsah/disktest/bi\\_antib\\_8.jpg](http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/uceb/obsah/disktest/bi_antib_8.jpg)>.
- [18] E-test. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2014-05-09]. Dostupné z: <[http://en.wikipedia.org/wiki/Epsilometer\\_test](http://en.wikipedia.org/wiki/Epsilometer_test)>.
- [19] Mikrotitrační destička. In: *Boundless.com* [online]. Dept. of Microbiology, JJMMC, Davangere [cit. 2014-05-10]. Dostupné z: <<https://www.boundless.com/microbiology/antimicrobial-drugs/measuring-drug-susceptibility/minimal-inhibitory-concentration-mic/images/measuring-minimal-inhibitory-concentration-via-the-microbroth-dilution-method/>>.
- [20] ČSN EN ISO 20743. *Textilie: Zjišťování antibakteriálního účinku textilních výrobků*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2014.
- [21] ČSN EN ISO 20645. *Plošné textilie: Zjišťování antibakteriální aktivity - Zkouška šíření agarovou destičkou*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2014.
- [22] ŠLAMBOŘOVÁ, Irena. TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI, Fakulta Přírodovědně-humanitní a pedagogická. *Využití antibakteriálních testů v textilním průmyslu* [prezentace]. Liberec. 69 s. [cit. 2013-05-04].
- [23] ČSN EN ISO 22610. *Metoda stanovení odolnosti proti penetraci mikrobiálních zárodků za mokra*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2014.
- [24] ČSN EN ISO 22612. *Metoda stanovení odolnosti proti penetraci mikrobiálních zárodků za sucha*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2014.
- [25] RŮŽIČKOVÁ, Jana. *Elektrostatické zvlákňování nanovláken*. Vyd. 2., nezměn. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2006, 54 s. ISBN 80-737-2066-3.
- [26] RAMAKRISHNA, Seeram. *An introduction to electrospinning and nanofibers*. Hackensack, NJ: World Scientific, c2005, xi, 382 p. ISBN 98-125-6454-3.
- [27] JIRSÁK, Oldřich. TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI, Fakulta textilní. *Výroba a vlastnosti nanovláken* [prezentace]. Liberec. 26 s. [cit. 2013-02-13].
- [28] MILITKÝ, Jiří. TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI, Fakulta textilní. *Nanotechnologie a textil* [prezentace]. Liberec. 43 s. [cit. 2013-01-27].
- [29] BEKLEMYSHEV, Vyacheslav Ivanovich a Igor Ivanovich MAKHONIN. Nanoscience and nanotechnologies: Nanomaterials and coatings with antimicrobial properties. in *Encyclopedia of life support systems*. Eolss Publisher, Paris, France. 2007, 10 p. [<http://www.eolss.net>].

- 
- [30] RAPLEY, Ralph a John M WALKER. *Molecular biomethods handbook*. 2nd ed. /. Totowa, NJ: Humana Press, c2008, xx, 1124 p. ISBN 16-032-7374-3.
- [31] NALWA, Hari Singh. *Handbook of nanostructured materials and nanotechnology*. Boston: Academic Press, c2000, 5 v. ISBN 01-251-3760-5.
- [32] SONG, Jooyoung, Haeyoung KANG, Choonghyeon LEE, Sun Hye HWANG a Jyongsik JANG. Aqueous Synthesis of Silver Nanoparticle Embedded Cationic Polymer Nanofibers and Their Antibacterial Activity. *ACS Applied Materials*. 2012- 01-25, vol. 4, issue 1, s. 460-465.
- [33] FOSTER, Howard A., Iram B. DITTA, Sajnu VARGHESE a Alex STEELE. Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, vol. 90, issue 6, s. 1847-1868.
- [34] FUJISHIMA, Akira, Tata N. RAO a Donald A. TRYK. Titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2000, vol. 1, issue 1, s. 1-21.
- [35] TSAI, Ting-Mi, Hsin-Hou CHANG, Kia-Chih CHANG, Yu-Lin LIU a Chun-Chieh TSENG. A comparative study of the bactericidal effect of photocatalytic oxidation by TiO<sub>2</sub> on antibiotic-resistant and antibiotic-sensitive bacteria. *Journal of Chemical Technology*. 2010, vol. 85, issue 12, s. 1642-1653.
- [36] MANESS P.C. ET AL (1999). Photosterilization and Photomineralization of Microbial Cells with Titanium Dioxide. Photochemistry and Photobiology: Abstracts of the 27th Annual Meeting of the American Society for Photobiology. 1999, Vol. 69 (s1). 64S-65S;
- [37] MATSUNAGA, T, R TOMODA a T NAKAJIMA. Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders. *FEMS Microbiol Lett*. 1985, vol. 29, s. 211-216.
- [38] LIOU, Je-Wen a Hsin-Hou CHANG. Bactericidal Effects and Mechanisms of Visible Light-Responsive Titanium Dioxide Photocatalysts on Pathogenic Bacteria. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2012, vol. 60, issue 4, s. 267-275.
- [39] PREMANATHAN, Mariappan, Krishnamoorthy KARTHIKEYAN, Kadarkaraithangam JEYASUBRAMANIAN a Govindasamy MANIVANNAN. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2011, vol. 7, issue 2, s. 184-192.
- [40] AZAM, Ameer, AHMED, OVES, KHAN, HABIB a Adnan MEMIC. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *International Journal of Nanomedicine*. 2012 s. 6003-6009.

- 
- [41] JIN, T., D. SUN, J.Y. SU, H. ZHANG a H.-J. SUE. Antimicrobial Efficacy of Zinc Oxide Quantum Dots against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis*, and *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Food Science*. 2009, vol. 74, issue 1, M46-M52.
  - [42] APPLEROT, Guy, Anat LIPOVSKY, Rachel DROR, Nina PERKAS, Yeshayahu NITZAN, Rachel LUBART a Aharon GEDANKEN. Enhanced Antibacterial Activity of Nanocrystalline ZnO Due to Increased ROS-Mediated Cell Injury: Stress Sensitive Photoluminescence in ZnO Tetrapod Filled Elastomers. *Advanced Functional Materials*. 2009, vol. 19, issue 6, s.
  - [43] JANGRA, Sant Lal, K. STALIN, Neeraj DILBAGHI, Sandeep KUMAR, Jai TAWALE, Surinder P. SINGH a Renu PASRICHA. Antimicrobial Activity of Zirconia (ZrO<sub>2</sub>) Nanoparticles and Zirconium Complexes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2012, vol. 12, issue 9, s. 7105-7112.
  - [44] ANDRÉ, Rute, Filipe NATALIO, Muhammad Nawaz TAHIR, Rüdiger BERGER a Wolfgang TREMEL. Self-cleaning antimicrobial surfaces by bio-enabled growth of SnO<sub>2</sub> coatings on glass. *Nanoscale*. 2013, vol. 5, issue 8, s. 3447-.
  - [45] AZAD, Abdul-Majeed, Sara Lynn MCKELVEY a Zainab AL-FIRDAUS. Fabrication of antimicrobial Titania nanofibers by electrospinning. *AMMTIAC Quarterly*. 2008, vol. 3, issue 3, s. 1-7.
  - [46] QI, Lifeng, Zirong XU, Xia JIANG, Caihong HU a Xiangfei ZOU. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*. 2004, vol. 339, issue 16, s. 2693-2700.
  - [47] LI, Li-Hua, Jian-Cheng DENG, Hui-Ren DENG, Zi-Ling LIU a Xiao-Li LI. Preparation, characterization and antimicrobial activities of chitosan/Ag/ZnO blend films. *Chemical Engineering Journal*. 2010-05-15, vol. 160, issue 1, s. 378-382.
  - [48] WANG, Yan, Qun ZHANG, Chen-lu ZHANG a Ping LI. Characterisation and cooperative antimicrobial properties of chitosan/nano-ZnO composite nanofibrous membranes. *Food Chemistry*. 2012, vol. 132, issue 1, s. 419-427.
  - [49] SCHEJBALOVÁ, Hana a Ivan STIBOR. Úvod do studia organické a makromolekulární chemie. Vyd. 1. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2004, 204 s. ISBN 80-708-3879-5.
  - [50] PROKOPOVÁ, Irena a Ivan STIBOR. Makromolekulární chemie. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2007, 207 s. ISBN 978-807-0806-623.
  - [51] BALDRICK, Paul. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2010, vol. 56, issue 3, s. 290-299.
  - [52] Polyethylene glycol. *Chemindustry.ru* [online]. [cit. 2013-04-24]. Dostupné z: <[http://chemindustry.ru/Polyethylene\\_Glycol.php](http://chemindustry.ru/Polyethylene_Glycol.php)>.
  - [53] Kyselina citronová. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2013-05-18]. Dostupné z: <[http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina\\_citronov%C3%A1](http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_citronov%C3%A1)>.
-



- [54] Triton X-100 (CAS 9002-93-1). *Santa cruz biotechnology* [online]. [cit. 2013-04-20]. Dostupné z: <<http://www.scbt.com/datasheet-29112-triton-x-100.html>>.
- [55] Triton X-100. *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2013-04-20]. Dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/x100?lang=en&region=CZ>>.
- [56] BÍNA, Jaroslav. HANA KEILOVÁ. Malá encyklopedie chemie. 1. vyd. Překlad Hana Keilová. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1976, 796 s. ISBN 04-619-76.
- [57] VOHLÍDAL, Jiří. Chemické a analytické tabulky. 1. vyd. Praha: Grada, 1999, 647s. ISBN 80-716-9855-5.
- [58] Síťovací reakce PVA, převzato z: ZHANG, Yun, Peter C. ZHU a David EDGREN. Crosslinking reaction of poly(vinyl alcohol) with glyoxal. *Journal of Polymer Research* [online]. 2010, vol. 17, issue 5 [cit. 2014-03-04]. Dostupné z: <<http://link.springer.com/10.1007/s10965-009-9362-z>>.
- [59] Zinc oxide. In: *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2013-04-22]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/544906?lang=en&region=CZ>
- [60] Titanium(IV) oxide. In: *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2013-04-22]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/718467?lang=en&region=CZ>
- [61] Zirconium(IV) oxide. In: *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2013-04-22]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/544760?lang=en&region=CZ>
- [62] Tin(IV) oxide. In: *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2013-04-22]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/549657?lang=en&region=CZ>
- [61] Schéma laboratorního zařízení pro elektrostatické zvlákňování. In: KETTNEROVÁ, Jana. *Vývoj filtračního materiálu obsahující biodegradabilní nano-vláknennou membránu pro vzduchovou filtraci*. Liberec, 2013. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci. Vedoucí práce Ing. Daniela Lubasová, Ph.D.
- [62] Schema EDX In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2014-03-10]. Dostupné z: <<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:EDX-scheme.svg>>.
- [63] KONG, Ming, Xi Guang CHEN, Ke XING a Hyun Jin PARK. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, vol. 144, issue 1, s. 51-63.
- [64] IKEDA, Tomiki, Shigeo TAZUKE a Yasuzo SUZUKI. *Die Makromolekulare Chemie*. vol. 185, issue 5, s. 869-876.
- [65] HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N., S. BAUTISTA-BAÑOS, M.G. VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M.G. MÉNDEZ-MONTEALVO, M.M. SÁNCHEZ-RIVERA a L.A. BELLO-PÉREZ. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb. Fr.) Vuill. *Carbohydrate Polymers*. 2008, vol. 73, issue 4, s. 541-547.

- [66] CHUNG, Y.C., JIA, G., WANG, H.L., WU, J.G., LIN, J.G., Relationship between antibacterial activity of chitosans and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2004, vol. 25, s. 932-936
- [67] NO, H. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*. 2002 vol. 74, 1-2, s. 65-72.
- [68] ZHONG, Z.M., XING, R.G., LIU, S., WANG, L. CAI, S.B., LI, P.C., Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities in vitro. *Carbohydrate Research*. 2008, vol. 343, s. 952-959
- [69] ROLLER, S. a N. COVILL. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, vol. 47, 1-2 s. 67-77.
- [70] WANG, Xiaohui, Yumin DU a Hui LIU. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex. *Carbohydrate Polymers*. 2004, vol. 56, issue 1, s. 21-26.
- [71] HELANDER, I.M, E.-L. NURMIAHO-LASSILA, R. AHVENAINEN, J. RHOADES a S. ROLLER. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 71, 2-3, s. 235-244.

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha A:	Předpisy pro zvlákňovací roztoky
Příloha B:	Grafy získané EDX analýzou připravených vzorků
Příloha C:	Výsledky testování antibakteriální aktivity metodou AATCC 147
Příloha D:	Studie Kong M. a kol. (2010) – Antibakteriální vlastnosti chitosanu

## Příloha A: Předpisy pro zvlákňovací roztoky

### 1) PVA roztoky:

Pro ZrO<sub>2</sub>:

Koncentrace roztoku	ZrO <sub>2</sub> [g]	PVA[g]	PAL Triton[g]	Celkem [g]
1 %	0,1	9,9	0,1	10,1
5%	0,5	9,5	0,1	10,1
10%	1,0	9,1	0,1	10,1

Pro ZnO:

Koncentrace roztoku	ZnO [g]	PVA [g]	PAL Triton [g]	Celkem [g]
1 %	0,1	9,9	0,1	10,1
5%	0,5	9,5	0,1	10,1
10%	1,0	9,1	0,1	10,1

Pro TiO<sub>2</sub>:

Koncentrace roztoku	TiO <sub>2</sub> [g]	PVA [g]	PAL – Triton [g]	Celkem [g]
1 %	0,075	9,925	0,1	10,1
5%	0,372	9,628	0,1	10,1
10%	0,745	9,255	0,1	10,1

Pro SnO<sub>2</sub>:

Koncentrace roztoku	SnO <sub>2</sub> [g]	PVA [g]	PAL – Triton [g]	Celkem [g]
1 %	0,122	9,878	0,1	10,1
5%	0,612	9,388	0,1	10,1
10%	1,224	8,776	0,1	10,1

---

2) CH/PEO roztokyPro ZrO<sub>2</sub>:

Koncentrace roztoku	ZrO <sub>2</sub> [g]	Chitosan/PEO[g]	PAL Triton[g]
1 %	0,05	4,95	0,05
10%	0,50	4,50	0,05

Pro ZnO:

Koncentrace roztoku	ZnO <sub>2</sub> [g]	Chitosan/PEO[g]	PAL Triton[g]
1 %	0,05	4,95	0,05
10%	0,50	4,50	0,05

Pro TiO<sub>2</sub>:

Koncentrace roztoku	TiO <sub>2</sub> [g]	Chitosan/PEO[g]	PAL Triton[g]
1 %	0,0373	4,9627	0,05
10%	0,3730	4,6270	0,05

Pro SnO<sub>2</sub>:

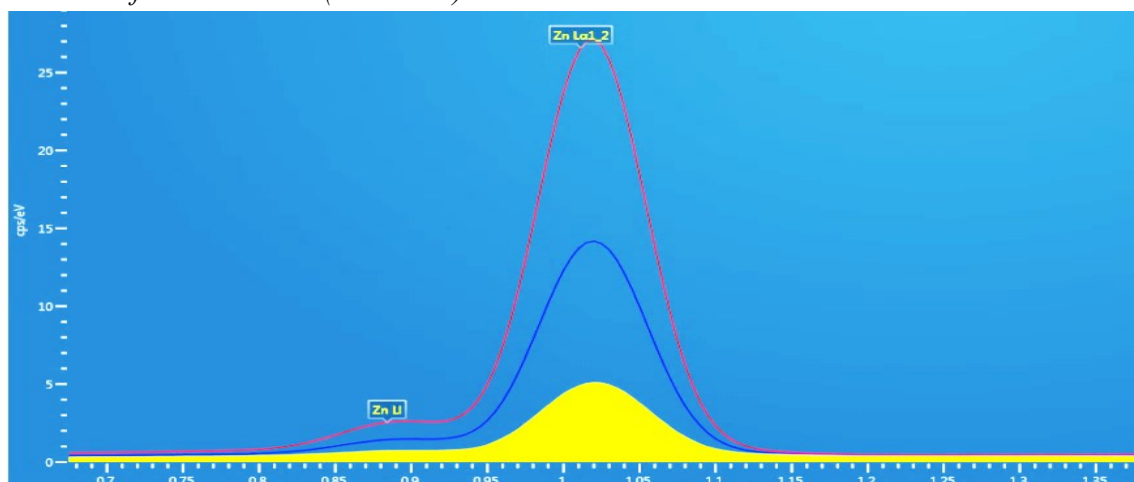
Koncentrace roztoku	SnO <sub>2</sub> [g]	Chitosan/PEO[g]	PAL Triton[g]
1 %	0,0611	4,9389	0,05
10%	0,6110	4,3890	0,05

---

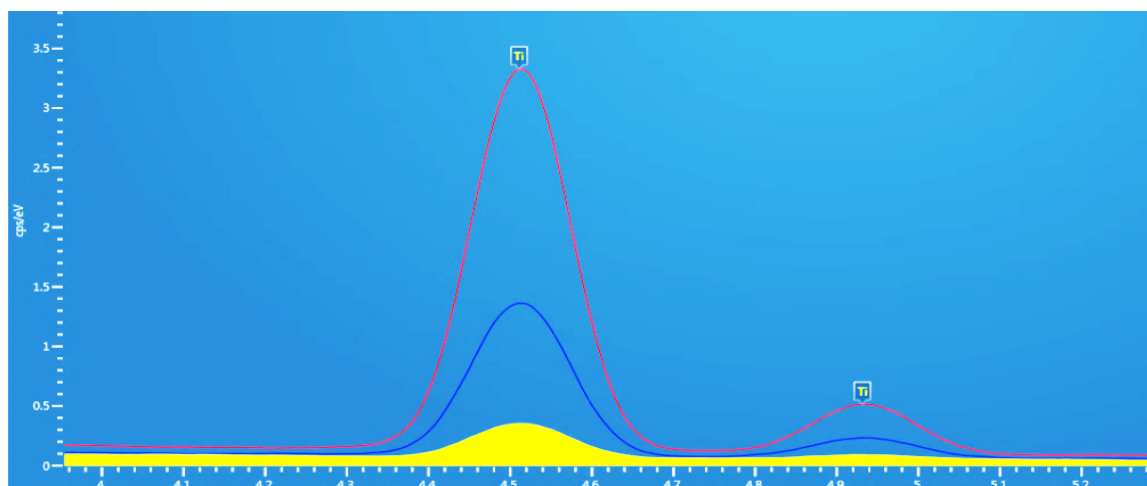
## **Příloha B:** Grafy získané EDX analýzou připravených vzorků

### 1. Membrána na bázi PVA – internální způsob inkorporace antibakteriální složky

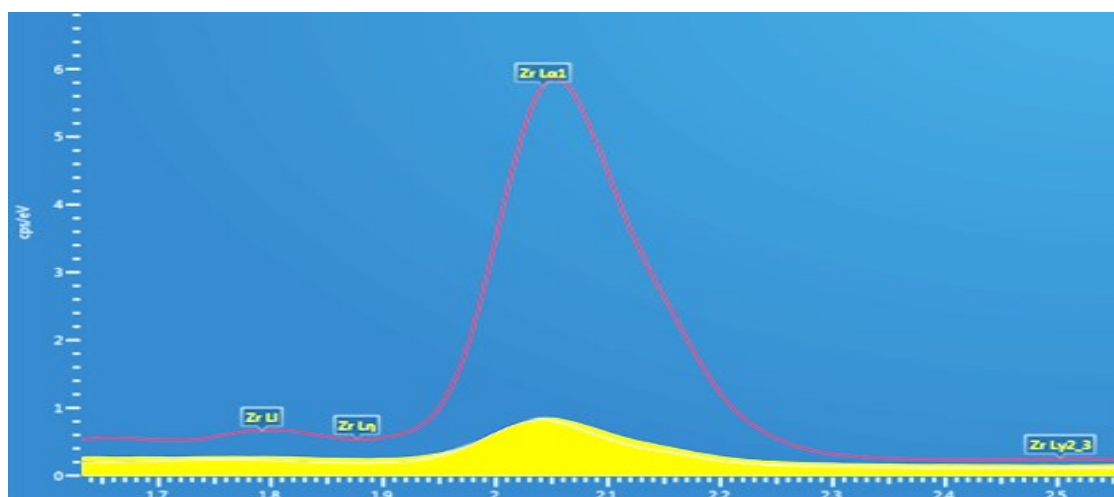
*Graf. 1. EDS - ZnO (internálně):*



*Graf. 2. EDS - TiO<sub>2</sub> (internálně):*

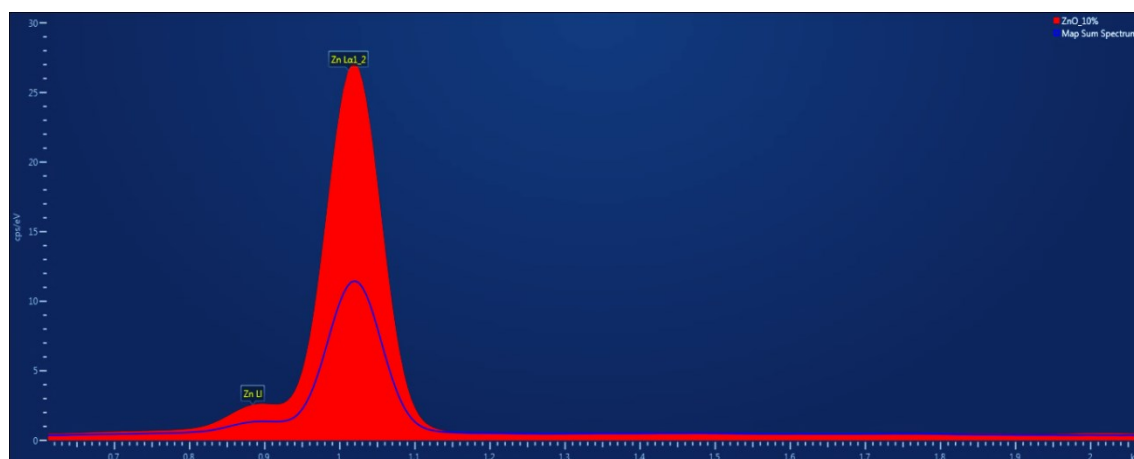


Graf. 3. EDS -  $\text{ZrO}_2$  (internálně):

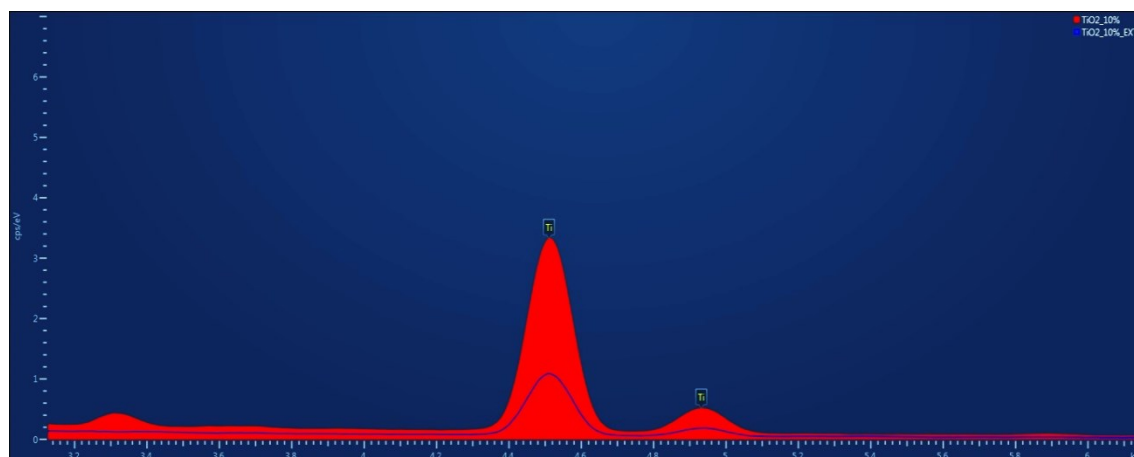


## 2. Membrána na bázi PVA – externální způsob inkorporace antibakteriální složky

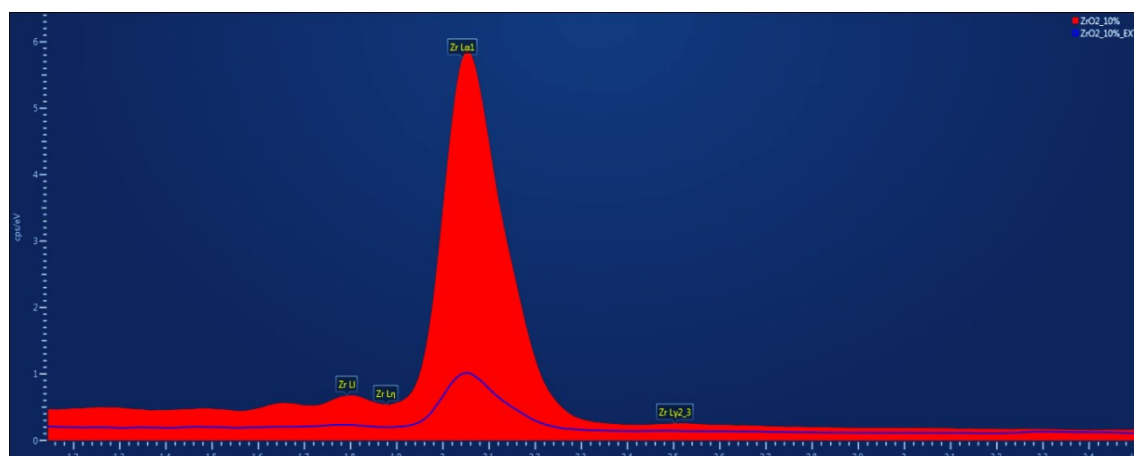
Graf. 4. EDS - ZnO (internálně X externální):



Graf. 5. EDS -  $\text{TiO}_2$  (internálně X externální):

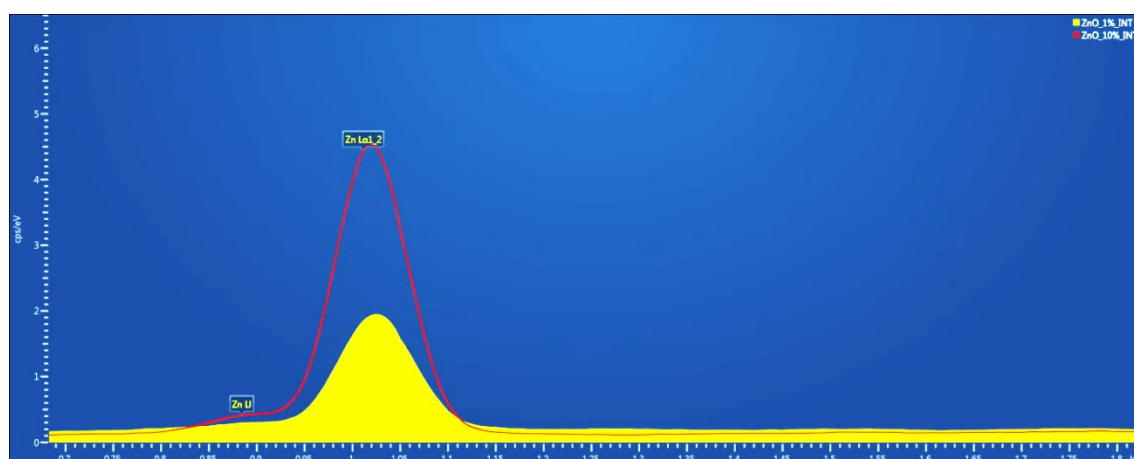


Graf. 6. EDS -  $\text{ZrO}_2$  (internálně X externální):

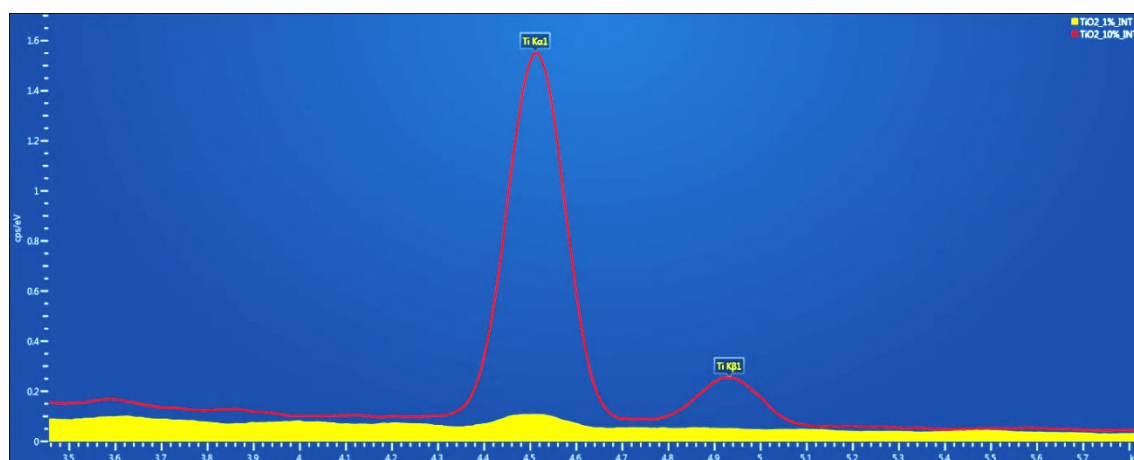


### 3. Membrána na bázi CH/PEO – internální způsob inkorporace antibakteriální složky

Graf. 7. EDS –  $\text{ZnO}$  (internálně X externální):

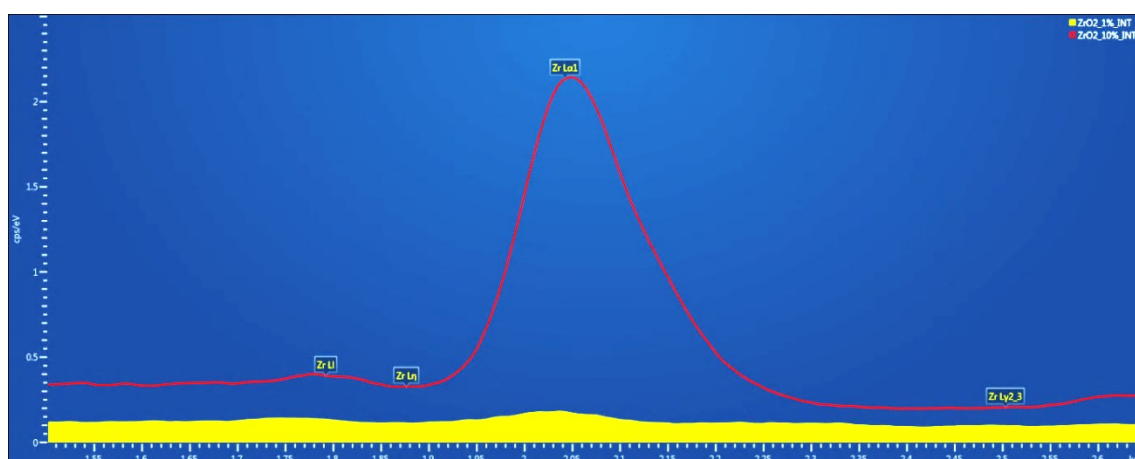


Graf. 8. EDS -  $\text{ZrO}_2$ (internálně X externální):





Graf. 9. EDS -  $\text{TiO}_2$  (internálně):



## Příloha C: Výsledky testování antibakteriální aktivity metodou AATCC 147

Tab.1. Shrnutí výsledků testovaných PVA vzorků (zesíťovaných) metodou AATCC 147

Antibakteriální aktivita testovaných vzorků		
Vzorek	<i>E. coli</i> (10 <sup>5</sup> CFU/ ml)	<i>S. aureus</i> (10 <sup>5</sup> CFU/ ml)
PVA 10%	Bez halo zóny	Bez halo zóny
PVA +TiO <sub>2</sub> 1%	Bez halo zóny	Bez halo zóny
PVA +TiO <sub>2</sub> 10%	<b>Halo zóna 1 mm, není čistá</b>	Bez halo zóny
PVA + SnO <sub>2</sub> 1%	Bez halo zóny	Bez halo zóny
PVA + SnO <sub>2</sub> 10%	Bez halo zóny	Bez halo zóny
PVA +ZnO 1%	<b>Halo zóna 1 mm, není čistá</b>	Bez halo zóny
PVA +ZnO 10%	<b>Halo zóna 3 mm, není čistá</b>	Bez halo zóny
PVA +ZrO <sub>2</sub> 1%	Bez halo zóny	Bez halo zóny
PVA +ZrO <sub>2</sub> 10%	Bez halo zóny	Bez halo zóny

Tab. 2. Shrnutí výsledků testovaných PVA vzorků (síťovaných) metodou AATCC 100

Antibakteriální aktivita testovaných vzorků		
Vzorek	<i>E. coli</i> (10 <sup>5</sup> CFU/ ml)	<i>S. aureus</i> (10 <sup>5</sup> CFU/ ml)
PVA 10%	100 bakteriálních kolonií	100 bakteriálních kolonií
PVA +TiO <sub>2</sub> 1%	200 bakteriální kolonie - 0% inhibice	200 bakteriální kolonie 0% inhibice
PVA +TiO <sub>2</sub> 10%	<b>50 bakteriální kolonie- 50% inhibice</b>	250 bakteriální kolonie - 0% inhibice
PVA + SnO <sub>2</sub> 1%	250 bakteriální kolonie - 0% inhibice	220 bakteriální kolonie - 0% inhibice
PVA + SnO <sub>2</sub> 10%	250 bakteriální kolonie – 0% inhibice	500 bakteriální kolonie - 0% inhibice
PVA +ZnO 1%	<b>90 bakteriální kolonie - 9% inhibice</b>	250bakteriální kolonie - 0% inhibice
PVA +ZnO 10%	<b>75bakteriální kolonie – 25% inhibice</b>	Kompaktní výsev - 0% inhibice
PVA +ZrO <sub>2</sub> 1%	350 bakteriální kolonie - 0% inhibice	600 bakteriální kolonie - 0% inhibice
PVA +ZrO <sub>2</sub> 10%	350 bakteriální kolonie – 0% inhibice	Kompaktní výsev - 0% inhibice

Tab.3. Výsledků testovaných PVA vzorků (nezesíťovaných) metodou AATCC 100- Externální inkorporace

Antibakteriální aktivita testovaných vzorků		
Vzorek	<i>E. coli</i> (10 <sup>5</sup> CFU/ ml)	<i>S. aureus</i> (10 <sup>5</sup> CFU/ ml)
PVA 10%	102 bakteriální kolonie	104 bakteriální kolonie
PVA +TiO <sub>2</sub> 10%	kompaktní výsev - 0% inhibice	kompaktní výsev - 0% inhibice
PVA + SnO <sub>2</sub> 10%	kompaktní výsev - 0% inhibice	kompaktní výsev 0% inhibice
PVA +ZnO 10%	10 bakteriální kolonie - <b>90% inhibice</b>	15 bakteriální kolonie - <b>85% inhibice</b>
PVA +ZrO <sub>2</sub> 10%	300 bakteriální kolonie - 0% inhibice	78 bakteriální kolonie - <b>25% inhibice</b>

## **Příloha D:** Studie – Antibakteriální vlastnosti chitosanu [63]

Tato studie se snaží shrnout prokázané antibakteriální vlastnosti chitosanu a vyšetřit způsob antibakteriálního působení. Chitosanem vyvolaná inhibice je způsobena několika faktory, které lze klasifikovat na: mikrobiální faktory (1), faktory způsobené strukturou chitosanu (2), faktor skupenství (3) a faktor okolního prostředí (4).

### *1) Mikrobiální faktor*

Bylo zjištěno, že chitosan vykazuje široké spektrum antibakteriální aktivity pro bakterie gram-pozitivní, gram-negativní, houby i kvasinky. Ve studii [65] bylo prokázáno, že chitosan působí proti plísním a houbám tak, že potlačuje sporulaci a klíčení spór. Některé studie [66,67] vykazovali lepší antibakteriální účinnost na gram-negativní bakterie a naopak studie [68] prokazuje lepší inhibiční efekt na gram-pozitivní bakterie. Rozdíl je přičítán rozdílnou bakteriální stěnou (bakterie gram-pozitivní vs. bakterie gram-negativní) a tím tedy i rozdílným mechanismem antibakteriálního působení chitosanu. Na základě dostupných studií vykazuje chitosan lepší účinnost proti plísním, než proti bakteriím obecně [69]. Mezi mikrobiální faktory se dále řadí stáří bakteriální buňky.

### *2) faktory způsobené vnitřní strukturou chitosanu*

Chitosan nese pozitivní náboj, který vede k silné elektrostatické interakci s dalšími prvky. Pozitivní náboj se týká i chitosanu ve spojení s kovem. Široké spektrum antibakteriální aktivity komplexu chitosan-Zn bylo prokázáno ve studii [70]. Dalším faktorem je molekulová hmotnost chitosanu, jeho hydrofilní/hydrofóbní charakteristika a schopnost chelatace, tzn. schopnost vázat organické sloučeniny na více-vazebný kationt - většinou kov. kationt kovu ve sloučenině má rozhodující vliv na stabilitu buněčné stěny.

### *3) Fyzikální skupenství*

Bylo zjištěno, že chitosan v kapalném skupenství má větší antibakteriální účinnost než v pevném skupenství. Antibakteriální aktivita v pevném skupenství je též ovlivněna pH. Mezi další faktory patří morfologie chitosanu, jako je tvar a specifický povrch.

### *4) Faktor okolního prostředí*

Důležitým faktorem pro antibakteriální aktivitu je pH. Vliv může mít i skutečnost, že chitosan je rozpuštěný v kyselém prostředí. Ve studii [71] vykazoval chitosan antibakteriální aktivitu pouze v kyselém prostředí. Zatím nebyla antibakteriální aktivita

chitosanu zkoumána v alkalickém prostředí. Dalším z faktorů je vazební schopnost, a teplota a čas, případně stáří chitosanu.[63]